



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**STUDIUM PROSTUPU VYBRANÝCH LÁTEK Z BEZOVÝCH  
EXTRAKTŮ PŘES BIOLOGICKOU MEMBRÁNU**

STUDY OF PENETRATION OF SELECTED SUBSTANCES FROM ELDERBERRY EXTRACTS THROUGH  
BIOLOGICAL MEMBRANE

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

Bc. Zuzana Škubalová

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

BRNO 2017

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP0991/2016  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Zuzana Škubalová**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.**  
Akademický rok: 2016/17

### Název diplomové práce:

Studium prostupu vybraných látek z bezových extraktů přes biologickou membránu

### Zadání diplomové práce:

Teoretická část:

- 1) Stručná charakteristika rutinu a kyseliny chlorogenové
- 2) Literární přehled o stanovení rutinu a kyseliny chlorogenové kapalinovou chromatografií
- 3) Stavba kůže
- 4) Transdermální absorpce

Experimentální část:

- 1) Ověření chromatografického systému pro separaci rutinu a kyseliny chlorogenové
- 2) Příprava extraktů z bezových větvíček
- 3) Studium penetrace fenolických sloučenin přes modelovou membránu s využitím Franzovy cely
- 4) Zpracování získaných dat a interpretace výsledků

### Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Zuzana Škubalová  
student(ka)

-----  
RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá studiem prostupu vybraných fenolických látek obsažených v extraktu bezu černého (*Sambucus nigra*) přes modelové systémy reprezentované dvěma typy syntetických membrán a reálný systém reprezentovaný biologickou membránou. Jako biologická membrána byla zvolena kůže z prasečího ušního boltce. Experimenty transdermální absorpce a absorpce přes syntetické membrány byly realizovány prostřednictvím vertikálních (Franzových) cel. Vybranými látkami obsaženými v extraktu bezu černého byly rutin a kyselina chlorogenová. Hlavním bodem této práce bylo zjistit jak ochotně nebo zda vůbec tyto dvě vybrané fenolické látky prostupují kůži a zvolenými syntetickými membránami. Procentuální vyjádření absorbovaného množství látky bylo stanoveno pomocí analýzy HPLC.

## ABSTRACT

This Diploma thesis focuses on the study of penetration of selected phenolic substances contained in extract from black elder (*Sambucus nigra*) via modelling systems represented by two types of synthetic membranes and a real system represented by a biological membrane. As a biological membrane, we have chosen skin from pig's earlobe. Experiments of transdermal absorption and absorption through synthetic membranes were conducted through vertical (Franz's) cells. Selected substances contained in the extract from black elder were rutin and chlorogenic acid. The main focus of this work was to determine how readily, or if at all, these two selected phenolic substances penetrate the skin and selected synthetic membranes. The percentage of absorbed amount of the substance was determined by HPLC analysis.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Fenolické látky, kůže, kožní membrána, syntetická membrána, absorpce, extrakt bezu černého, Franzova cela, HPLC.

## KEYWORDS

Phenolic compounds, skin, skin barrier, synthetic barrier, absorption, extract of elderberry, Franz's cell, HPLC.

ŠKUBALOVÁ, Z. *Studium prostupu vybraných látek z bezových extraktů přes biologickou membránu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. XY s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D..

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce RNDr. Mileně Vespalcové Ph.D. za její čas a rady při řešení této diplomové práce, dále bych chtěla velmi poděkovat Ing. Jaromírovi Pořížkoví Ph.D. za pomoc při zpracovávání dat a cenné rady a doporučení, nemalé poděkování patří také Mgr. Radimu Krchňáčkoví za pomoc s typografickou stránkou mé diplomové práce a se zpracováváním dat.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část.....</b>	<b>10</b>
2.1	Fenolické látky .....	10
2.1.1	Flavonoidy.....	11
2.1.2	Fenolické kyseliny.....	19
2.2	Kůže.....	21
2.2.1	Absorpční a exkreční činnost kůže.....	23
2.2.2	Stárnutí kůže.....	25
2.3	Možnosti měření transdermální absorpce .....	27
2.4	Současný stav studia transdermální absorpce fenolických látek .....	29
2.5	Studium možností HPLC pro měření rutinu a kyseliny chlorogenové .....	32
<b>3</b>	<b>Experimentální část.....</b>	<b>34</b>
3.1	Použité chemikálie.....	34
3.2	Použité přístroje.....	34
3.3	Další pomůcky a příslušenství .....	34
3.4	Příprava zkušebních roztoků pro transdermální absorpci .....	35
3.5	Příprava standardních roztoků pro HPLC.....	35
3.6	Příprava zásobního roztoku chloridu sodného.....	36
3.7	Příprava extraktu z bezu černého.....	36
3.8	Příprava kožních membrán .....	36
3.9	Difuzní cely .....	38
3.9.1	Odběr vzorků.....	39
3.10	Předpoklady míry absorpce vybraných látek přes kůži .....	40
3.11	Analýza HPLC.....	41
3.12	Mez detekce (LOD), mez stanovitelnosti (LOQ) a kalibrační závislost .....	41
3.13	Příprava kalibrační řady.....	42
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuze .....</b>	<b>43</b>
4.1	Difuzní cely .....	43
4.1.1	Příprava kožní membrány .....	43
4.2	Metoda HPLC pro studium absorpce zkoumaných látek.....	44
4.2.1	Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) .....	46
4.2.2	Kalibrační křivka rutinu .....	47
4.2.3	Kalibrační křivka kyseliny chlorogenové.....	48
4.3	Závislost množství absorbované látky na čase působení .....	49
4.3.1	Srovnání absorpce rutinu ve zkušebním roztoku s ohledem na čas působení .....	50
4.3.2	Srovnání absorpce k. chlorogenové ve zkušebním roztoku s ohledem na čas působení .....	53
4.3.3	Srovnání absorpce směsi kyseliny chlorogenové a rutinu s ohledem na čas působení.....	56
4.3.4	Srovnání absorpce extraktu bezu černého s ohledem na čas působení. ....	59

4.4	Srovnání míry transdermálního prostupu modelového systému s reálným systémem .....	63
4.4.1	Diskuze výsledků absorpce rutinu v modelovém a reálném systému.....	63
4.4.2	Diskuze výsledků absorpce kyseliny chlorogenové v modelovém a reálném systému .....	64
4.4.3	Srovnání prostupu rutinu a kyseliny chlorogenové .....	65
<b>5</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>Použitá literatura.....</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů.....</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>Seznam příloh .....</b>	<b>73</b>

# 1 ÚVOD

Vedle výzkumů zaměřených na výrobu a vývoj syntetických léčiv a syntetických kosmetických prostředků se stále častěji objevují výzkumy zaměřené na studium, vývoj a výrobu přípravků na přírodní bázi nebo ve spojení přírodních látek se syntetickými sloučeninami.

Stále více jsme zahlceni syntetickými nesnadno rozložitelnými materiály, které zahlcují jak lidský organismus, tak celou planetu, proto se lidé, výzkumy, výroby a studia snaží navracet zpět k přírodě a hledat, co je využitelné, užitečné a přirozené pro lidský organismus.

Fenolické látky mají nemalý význam ve výzkumu a vývoji hledání nových cest k uzdravení, zlepšení vzhledu nebo nalezení nových léčiv proti závažným onemocněním. Na první pohled by se tyto sekundární metabolity rostlin mohly zdát jako ne příliš užitečné nebo důležité pro lidský organismus, opak je ale pravdou. Tyto látky jsou obsaženy ve většině ovoce a zeleniny, bylinách a jiných rostlinách, tvoří nedílnou součást lidské potravy. Aniž bychom si to uvědomovali plní v našem organismu velmi důležité protektivní funkce a účastní se mnoha metabolických drah, nejen v lidském těle. Jsou to látky chemicky velmi různorodé, mimo jiné dávají květinám charakteristické vůně a barvy, které pak lákají hmyz, takže jejich funkce je mnohem komplexnější, než by se mohlo zdát. Pro své blahodárné účinky jsou využívány jak ve farmacii, lékařství, správné výživě, tak v i kosmetice. Právě kosmetika a blahodárné účinky fenolických látek na lidskou pokožku a organismus jsou stěžejními body této práce.

Hlavními zkoumanými fenolickými látkami jsou rutin a kyselina chlorogenová. Tyto látky jsou v nemalém množství obsaženy v bezu černém, který jak známo se hojně vyskytuje všude v přírodě mírného klimatického pásu. Právě protože tento keř volně roste na mnoha snadno dostupných místech a obsahuje fenolické látky ve využitelném množství je velmi vhodným kandidátem pro zpracovávání nejen v kosmetickém průmyslu.

Rutin a kyselina chlorogenová jsou díky svým pozitivním účinkům, proti stárnutí kůže, proti rakovinnému bujení, proti oxidačním procesům v organismu nebo protizánětlivým procesům velmi studovanými látkami. Proto se také tato práce zabývá těmito výjimečnými látkami. Jedním z hlavních cílů této práce je zjištění, zda jsou tyto dvě fenolické látky vhodné pro použití v kosmetických přípravcích, z pohledu prostupnosti kůže, zda vůbec procházejí a pokud ano, jakou měrou a jak rychle degradují.

Pro studium transdermální absorpce se běžně využívá testování in vitro nejčastěji na prasečí kůži, která je anatomicky i histologicky velmi podobná kůži lidské. Vůbec



nejpodobnější lidské stavbě kůže ve všech ohledech je kůže z prasečího ušního botce, která je právě v této práci využívána pro studium prostupnosti rutinu a kyseliny chlorogenové. Stěžejním bodem této práce je zjišťování prostupu biologickou membránou těchto dvou výše zmiňovaných fenolických látek z extraktu bezu černého, který je tak hojným zdrojem těchto sloučenin.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Fenolické látky

Fenolické látky jsou fytochemikálie neboli sekundární metabolity rostlin. Zřejmě jsou rostlinami vytvářeny v reakci na stresové prostředí. Nejsou to živiny nezbytně nutné pro zdravý vývoj jedince, ale mohou pomoci zajistit lepší kvalitu života nebo zkrátit období nemoci.

Fenolické látky mají ve své struktuře alespoň jedno aromatické jádro substituované jednou nebo více OH-skupinami. Fenolické látky s více než jednou OH-skupinou označujeme jako polyfenolické látky [1], zahrnují podskupiny jako fenolové kyseliny, flavonoidy, přírodní barviva, lignany a další, všechny jsou produkovány různými částmi rostlin [2].

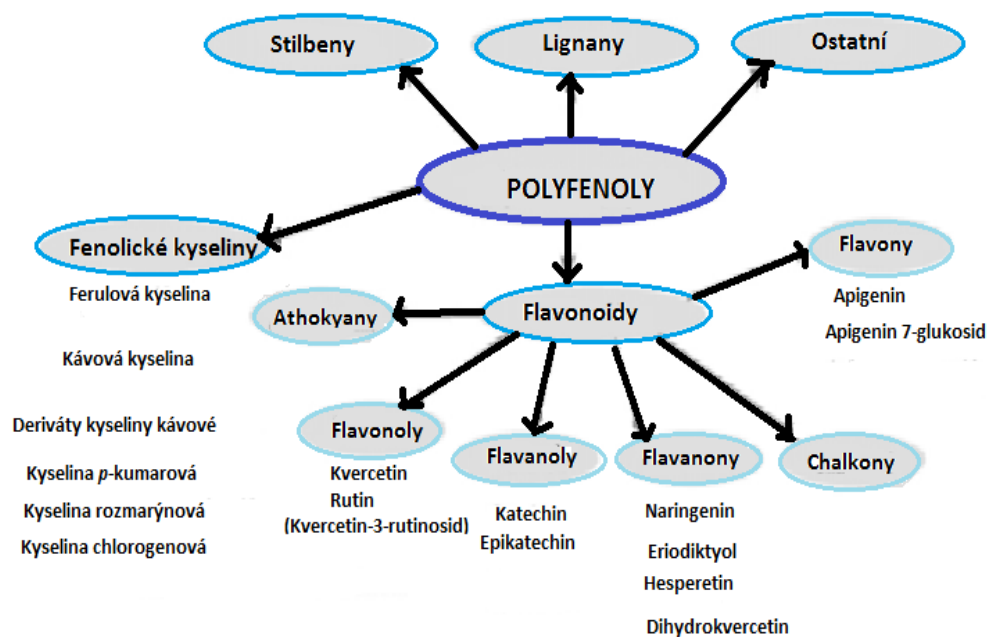
V rostlinách se vyskytují strukturně velmi různorodé fenolové sloučeniny [3] uložené v blízkosti chloroplastů nebo akumulovány ve vakuolách, kde mohou polymerovat a posilovat buněčnou stěnu [4]. Vzhledem k jejich rozšíření a vysoké koncentraci v rostlinách jsou běžnou součástí lidské potravy.

V současnosti roste zájem o studium těchto přírodních látek, jejich příjem v potravě je totiž dáván do souvislosti se snížením výskytu závažných nemocí jako je rakovina a kardiovaskulární choroby. Epidemiologická data upozorňují na korelaci mezi množstvím flavonoidů v potravě a snížením rizika kardiovaskulárních onemocnění, v některých klinických studiích o více než 50 %. Nižší pravděpodobnost nádorových onemocnění u osob, které konzumují více potravin bohatých na polyfenoly, není tak zřejmá a akceptovaná u odborné veřejnosti, jako je tomu u kardiovaskulárních onemocnění. Přesto i zde některé studie naznačují, že příjem potravin obsahující určité polyfenoly, může chránit organismus před některými formami rakoviny, především rakoviny plic, trávicího traktu a rakoviny prsu u žen a také rakoviny prostaty u mužů.

Předpokládá se, že na protektivním účinku se podílí schopnost rostlinných polyfenolů zhaset reaktivní kyslíkové radikály a omezovat jejich tvorbu chelatací iontů přechodných kovů. Především kationty železa jsou schopny generovat vysoce reaktivní hydroxylové radikály. Polyfenoly chrání lipoproteiny o nízké hustotě před oxidační modifikací, která je považována za jeden z klíčových dějů při rozvoji aterosklerózy. Mohou také působit proti vzniku krevních sraženin a tímto způsobem snižovat riziko infarktu myokardu nebo mozkové mrtvice.

Rostlinné polyfenoly jsou nejrozšířenějšími sloučeninami s redukčními účinky v naší stravě. Rovněž v testech antioxidační aktivity často předčí vitamíny nebo endogenní antioxidanty jako je např. kyselina močová [3].

Přesto mohou mít ojediněle i negativní vliv, mohou například omezovat využití bílkovin, thiaminu a železa [5].



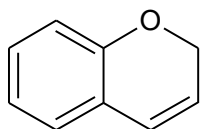
Obr. 1: Rozdělení polyfenolických látek [5]

### 2.1.1 Flavonoidy

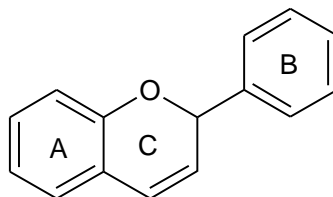
Nejrozšířenější skupinou fenolických látek jsou flavonoidy, malé molekuly kolem 300 Da. V přírodě se vyskytují většinou vázané na cukry (glykosidy), které je činí rozpustnějšími. Necukerná jednotka se nazývá aglykon. Pro všechny flavonoidy je typ cukru, na který je navázán aglykon charakteristický a v dané konfiguraci se vyskytují nejčastěji, např. kvercetin se nejčastěji váže na rhamnosu a galaktosu, s jinými cukry se konjuguje jen málo [1].

Flavonoidy jsou odvozeny kondenzací kyseliny skořicové se třemi malonyl-CoA skupinami. Všechny flavonoidy vznikají touto iniciační reakcí, jež je katalyzována enzymem chalkon syntázou. Chalkon je většinou velmi rychle přeměněn na fenylobenzopyran (flavan, fenylochroman), ten je poté dalšími modifikacemi převeden na flavony, isoflavonoidy, flavonoly nebo anthokyany. Hlavně prostřednictvím glykosilace, ale také acylace a alkylace je podmíněna velká variabilita struktur flavonoidů napříč celou rostlinnou říší [6].

Flavonoidy mají nejčastěji 15uhlíkovou strukturu tvořenou dvěma fenolickými kruhy [1]. Většinou se jedná o uspořádání  $C_6-C_3-C_6$ , řetězec  $C_3$  bývá součástí heterocyklického kruhu (pyranového) kruhu. Flavonoidy jsou tedy odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny 2H-chromenu, je substituovaný v poloze  $C_2$  fenylovou skupinou, nazývá se fenylobenzopyran (flavan, fenylochroman), jak už bylo zmíněno v přechozím odstavci.



2H-chromen

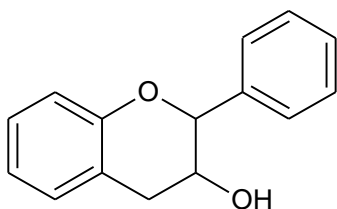


Flavan- základní jednotka flavonoidů

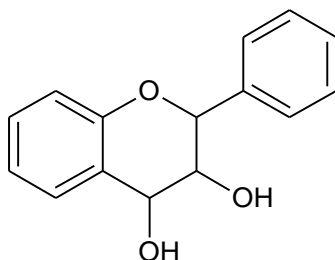
Všechny tři kruhy flavanu bývají substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami, jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm oxidace a substituce. Mohou se vyskytovat volně nebo jako glykosidy, častější varianta.

Takže podle stupně oxidace  $C_3$  řetězce se dělí na následující základní struktury flavonoidů:

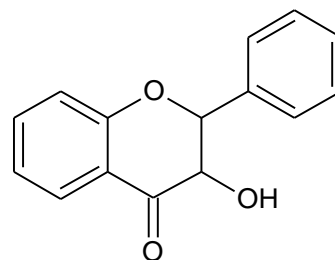
- 1) Katechiny (flavan-3-oly)
- 2) Leukoanthokyanidiny (flavan-3,4-dioly)
- 3) Flavanonoly
- 4) Flavonoly
- 5) Flavanony
- 6) Flavony
- 7) Anthokyanidiny



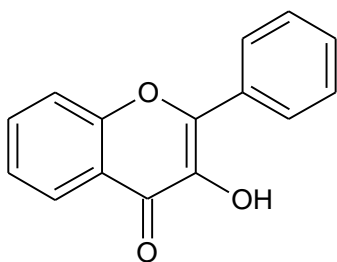
Katechiny



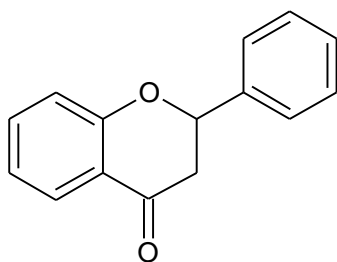
Leukoanthokyanidiny



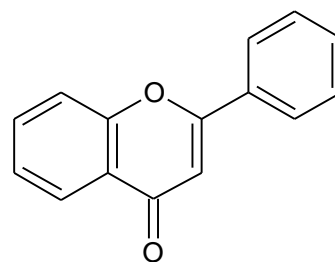
Flavanonoly



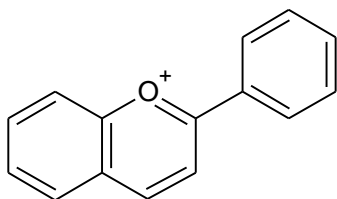
Flavonoly



Flavanony



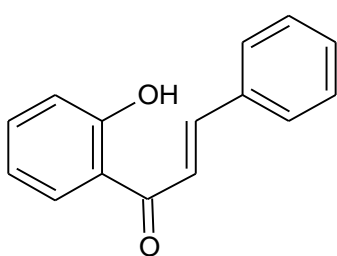
Flavony



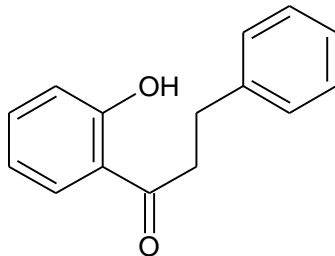
Anthokyanidiny

Dále rozeznáváme strukturně podobné sloučeniny, produkty biosyntézy a katabolismu flavonoidů. Kruhy A a B jsou zde spojeny s alifatickým  $C_3$  řetězcem nebo řetězcem, který je jen částečně součástí furanového cyklu:

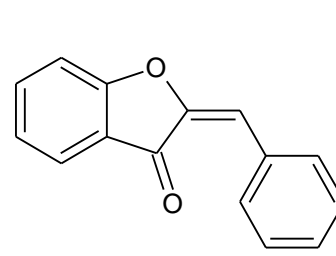
- 1) Chalkony a Dihydrochalkony
- 2) Aurony



Chalkony



Dihydrochalkony



Aurony

Další sloučeniny odvozené od základní struktury flavonoidů, jsou isoflavonoidy a neoflavonoidy. Jsou to méně běžné sloučeniny, mají kruh B spojený s pyranovým kruhem C v poloze C-3 v případě isoflavonoidů a v poloze C-4 v případě neoflavonoidů [7].

V jiné literatuře je možné najít také starší dělení na anthoxanthiny a anthokyany, podle barvy flavonoidů. Anthoxanthiny nemají výraznou barvu, jsou špinavě žluté, naproti tomu anthokyany jsou barevnými pigmenty rostlin od červené po modrou [1]. Slovo anthokyany je odvozeno z řeckých slov: *anthos*, květina a *kyanos*, modrý. Anthoxanthiny jsou odvozeny od řeckých slov *anthos*, květina a *xanthos*, žlutý [8]

Athoxanthiny se dále dělí na: 1) flavonoly, flavony, flavan-3-oly (katechiny)

2) flavanony

3) isoflavonoidy

Flavonoly, flavony a flavan-3-oly přijímáme v potravě nejhojněji. Mezi nejběžnější flavonoly se řadí kvercetin, kemferol, myricetin, jsou obsaženy v cibuli, jablkách, bylinných výluzích, víně atd. [1]. V ještě větším množství se flavonoly a jejich glykosidy vyskytují v čaji (v listech keře). V černých čajích bývá např. přítomno 0,4-1,7 % glykosidů, v zeleném čaji 1,5- 1,7 % a v instantních čajích 2,6-3,1 % v sušině. Tyto látky přispívají k trpké chuti čajových nálevů [9]. Nejdůležitější flavony jsou luteolin a apigenin obsažené v celeru nebo petrželi [1]. U flavonů se nevyskytují *O*-diglykosidy. Nejběžnější z *C*-glykosidů jsou vitexin a orientin v rýžových otrubách a v různých druzích ovoce. Běžný je i isovitexin a isoorientin. Orientin a osiorientin mají antioxidační vlastnosti [7]. Flavan-3-oly zahrnují látky jako katechin, epikatechin nebo allokatechin, často se vyskytující jako estery s kyselinou gallovou tzv. galláty, jsou obsaženy např. v zeleném čaji, čokoládě, červeném víně a jablkách, bohužel jejich biologická dostupnost je pouze kolem 20 %.

Flavanony jsou bezbarvé až světle žluté, tvoří minoritní část flavonoidů, jsou obsaženy pouze ve specifických druzích ovoce a zeleniny, příkladem mohou být citrusové plody, slupky rajčat atd. Do této skupiny řadíme neohesperidin a naringin, ty jsou zodpovědné za hořkou chuť slupky pomerančů a grapefruitů, dále sem patří také hesperidin, který je hlavním glykosidem u pomerančů [1]. Další Flavanony jsou likviritin, výskyt v lékořici, sakuranin a prunin v plodech slivoní, glykosidy pinocembrinu v luštěninách [7].

Isoflavonoidy se vyskytují zejména v luskovinách. Jejich důležitým zdrojem ve stravě je sója, ta obsahuje daidzein, glycitein a genitein [1].

Anthokyany (anthokyaniny) jsou glykosidy různých aglykonů, nazývajících se anthokyanidiny. Všechny anthokyanidiny jsou odvozeny od jediné základní struktury, fenylobenzopyryliového kationu. Anthokyany tvoří rozsáhlou skupinu rostlinných barviv, dosud bylo identifikováno kolem 300 druhů anthokyanů v přírodních zdrojích [7]. Mezi 6 nejvýznamnějších anthokyanidinů s hydroxyskupinou v poloze C-3 majících význam v potravinách, patří kyanidin (název podle lat. Názvu chrpy), delphinidin (stračky), pelargonidin (pelargonie), peonidin (pivoňky), petunidin (petunie), malvidin (slézu).

Anthokyny jsou rozpustné ve vodě. A barvy materiálů, ve kterých jsou obsaženy, jsou barvou těchto glykosidů. Volné aglykony anthokyanidiny se v rostlinných pletivech vyskytují jen zřídka, tvoří stopová množství produktů hydrolýzy anthokyanů nebo vznikají z leukoanthokyanidinů. Hlavními pigmenty jsou vždy glykosidy anthokyanidinů, tedy anthokyany [6, 9]. Jejich barva závisí na pH, mění jejich chemickou strukturu a tím i světelné absorpční vlastnosti, přecházejí od červené po tmavě modrou barvu. V alkalickém prostředí jsou velmi nestálé, rozkládají se také působením světla. Jsou nejméně biologicky dostupné, jejich dostupnost je 0,1-1 % [1].

#### ***2.1.1.1 Účinky flavonoidů na zdraví***

Předpokládanou ochrannou funkcí flavonoidů je jejich antioxidační působení, podle předpokladů flavonoidy zachytávají volné radikály vznikající v metabolismu a tím brání oxidaci tuků v buněčných membránách. Reaktivní formy kyslíku, jako jsou volné radikály s nepárovým valenčním elektronem např. superoxidový aniont  $O_2^-$ , hydroxylový aniont  $OH^-$  a jiné reaktivní formy kyslíku jako  $H_2O_2$ , jsou příčinou rakovinového bujení, aterosklerózy nebo zánětu. Flavonoidy těmto radikálům poskytují volný elektron a tím je deaktivují. V mnoha studiích in vitro byla potvrzena eliminace lipidových peroxylových radikálů, radikálů superoxidových aniontů nebo singletového kyslíku [1].

Další studie prokázaly, že Flavonoidy inhibují NADH oxidázu a regulují syntézu oxidu dusného (NOS), také inhibují xanthinoxidasu, enzym metabolismu purinů, který produkuje volné radikály a tím zvyšuje oxidační stres organismu. Dále inhibují cyklooxygenasy, tyto enzymy katalyzují přeměnu arachidonátu na prozánětlivé prostaglandiny, tato inhibice může snížit výskyt chronických zánětů [1].

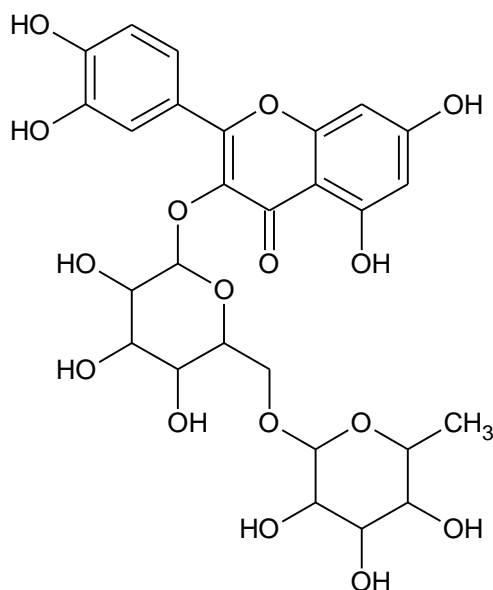
Při aterosklerotických stavech dochází k oxidaci nízkodenzitních (LDL+VLDL) lipoproteinů pod povrchem aorty, v aortním subendotheliu. Oxidace LDL má aterogenní

účinek, což zapříčiňuje smrt arteriálních buněk a zvýšení arteriálního pronikání LDL a akumulaci zánětlivých buněk v arteriální stěně. V aortním subendotheliu jsou proteiny vázané na extracelulární matrix proteinů a v tomto prostředí jsou pomalu oxidovány. Poté zde dochází ke snižování koncentrace protektivních velkých molekul antioxidantů jako jsou proteiny a enzymy. Polyfenoly, které jsou rozpustné ve vodě i v lipidech, mohou poskytnout ochranu aortnímu endotheliu, pokud se naváží na lipoproteiny a ochrání je před oxidací. V literatuře o tomto způsobu ochrany nacházíme zmínky: Tikkaken a spol. [5] Prokázali, že sójové isoflavony se váží velmi silně na LDL. Hayek a spol. Zjistili, že polyfenoly v červeném víně, kvercetin a katechin, se také váží silně na LDL a redukuje aterosklerózu. Také bylo prokázáno, že černý i zelený čaj chrání LDL+VLDL proti oxidaci. [5]. Flavonoidy buď zabraňují přímo oxidaci LDL nebo chrání vitamin E a karotenoidy, tedy jiné antioxidanty, jež jsou součástí molekuly LDL [1].

Reaktivní kyslíkaté sloučeniny (ROS) mají velký význam v poškozování DNA. Probíhající výzkumy prokazují protektivní účinek polyfenolů obsažených v zeleném čaji, mají antioxidační účinek vůči ROS, jako jsou volné lipidové radikály, superoxidové radikály, kyslíkové singlety nebo hydroxylové radikály. Tyto děje podmiňují antimutagenní a antikarcinogenní účinky a tím ochranu DNA [6].



### 2.1.1.2 Rutin (kvercetin-3- $\beta$ -rutinosid)



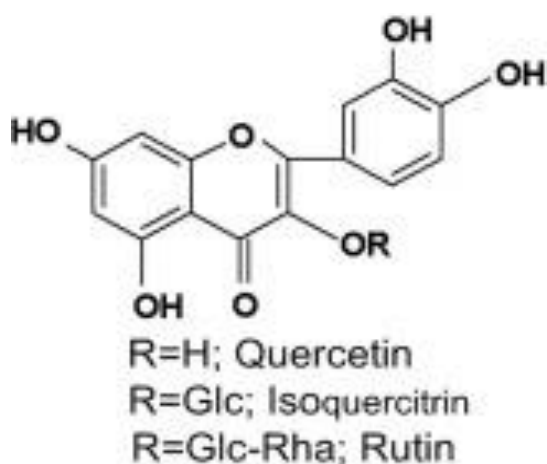
Rutin je glykosid flavonu (kvercetin), patřící do skupiny flavonolů, je přítomný v mnoha rostlinách, dříve byl označován jako vitamin P (permeability vitamin). Jeho struktura je tvořena aglykonem-kvercetin a glykosidicky navázaným disacharidem rutinosa [9].

Rutin je vyššími rostlinami produkován jako protektivní látka proti ultrafialovému záření a některým chorobám. Je to sekundární metabolit přítomný v širokém spektru rostlin, ale relativně vzácně se vyskytuje v požitelných částech rostlin. Nejvíce rutinu je akumulováno ve stoncích a svrchních listech. Poprvé byl detekován v *routě graveolens*, jež dala triviální název této farmaceuticky významné sloučenině [10]. Nejhojněji se vyskytuje v pohance a routě, ale také v ovoci a zelenině, jako i v bezu černém, v jeho plodech, ale i ve větvích a listech [9]. Dále se vyskytuje v šípkách nebo v černém, ale ne červeném rybízu a chybí také v jahodách.

Jako většina flavonoidů má i rutin antioxidační účinky jeho dalšími výjimečnými vlastnostmi je působení proti zvyšování křehkosti kapilár, spojené s krvácivými onemocněními, snižuje vysoký krevní tlak, snižuje propustnost cév a má antiedemické účinky a tím snižuje i riziko vzniku aterosklerózy [10]. Ve spojení s dalšími flavonoidními látkami zvyšuje hladinu kyseliny askorbové v různých živočišných orgánech a to tak, že ji chrání před oxidací katalyzovanou ionty kovů nebo zvyšuje její utilizaci v organismu. Proto jsou účinnější přirozené zdroje askorbové kyseliny obsahující i flavonoidy př. šípky než syntetický vitamin C [7].

Kvercetin se vyskytuje jako glykosidická forma, ale i jako glukosidická, galaktosidická, rhamnosidická, arabinosidická a rutinosidická (rutin). Kvercetin má vyšší antioxidační aktivitu

než rutin, která se projevuje antialergickou aktivitou, proti-rakovinovou aktivitou, snižováním hladiny glukózy v krvi a antibakteriální aktivitou. Vysoké koncentrace kvercetinu byly nalezeny v brokolici, jablkách, čaji, fazolích, cibuli a kapustě. V roce 1999 mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) došla k závěru, že kvercetin je potenciálním antirakovinným agens pro člověka. Ve Spojených státech amerických a v Evropě, jsou již doplňky s kvercetinem komerčně dostupné [11].



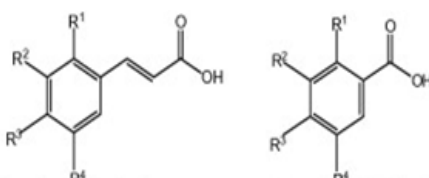
Obr. 2: Možné substituenty na základní glykosidické struktuře [12]

### 2.1.2 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny můžeme rozdělit na dvě hlavní skupiny viz Obr. 3:

- 1) hydroxyskořicové kyseliny
- 2) hydroxybenzoové kyseliny

Jsou tedy odvozeny od kyseliny benzoové nebo skořicové, tyto sloučeniny mají alespoň jedno aromatické jádro, kde je alespoň jeden kyslík substituován hydroxylovou skupinou.

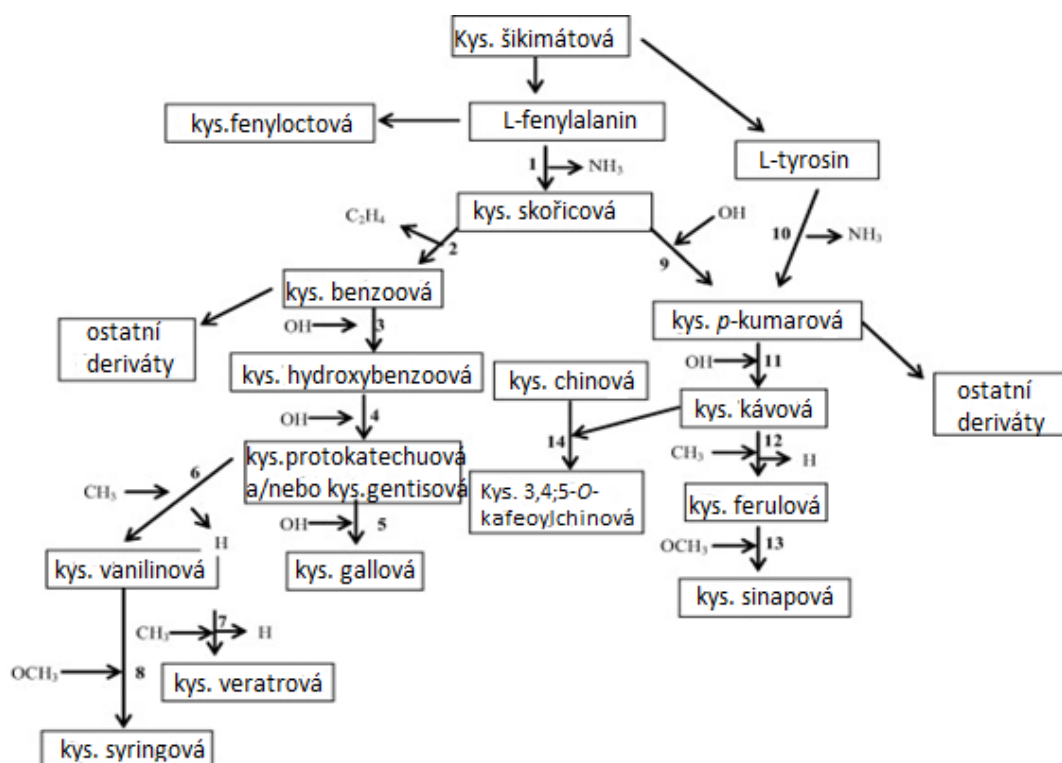


Substituence	Deriváty kyseliny skořicové	Deriváty kyseliny benzoové
R <sup>1</sup> =OH	kyselina <i>o</i> -kumarová	-
R <sup>3</sup> =OH	Kyselina <i>p</i> -kumarová	Kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová
R <sup>3</sup> =R <sup>4</sup> =OH	Kyselina kávová	kyselina protocatechová
R <sup>2</sup> =OCH <sub>3</sub> , R <sup>3</sup> =OH	Kyselina ferulová	Kyselina vanilová
R <sup>2</sup> =R <sup>3</sup> =OCH <sub>3</sub>	-	Kyselina veratrová
R <sup>2</sup> =R <sup>3</sup> =R <sup>4</sup> =OH	-	Kyselina galová
R <sup>1</sup> =R <sup>4</sup> =OH	-	Kyselina gentisová
R <sup>2</sup> =R <sup>4</sup> =OCH <sub>3</sub> , R <sup>3</sup> =OH	Kyselina sinapová	Kyselina siringová
R <sup>1</sup> =OH, R <sup>4</sup> =HSO <sub>3</sub>	-	Kyselina 5-sulfosalicilová
R <sup>2</sup> =R <sup>3</sup> =OH	Kyselina 3,4 nebo 5-O-kafeoylchinová	

\*Karboxylová skupina je esterifikována s kyselinou chinovou

Obr. 3: Rozdělení fenolických kyselin [13]

Fenolické kyseliny patří stejně jako flavonoidy mezi fenolické látky, takže jsou to také sekundární metabolity rostlin a hub. Jsou produkovány proti působení UV-záření, hmyzu, virům a bakteriím, jak již bylo zmíněno v přechozích kapitolách. Některé rostliny je dokonce produkují za účelem inhibice růstu jiných rostlinných druhů, příkladem fenolických kyselin s tímto účinkem mohou být kávová a ferulová kyselina. Fenolické kyseliny jsou syntetizovány šikimátovou dráhou z *L*-fenylalaninu a z *L*-tyrosinu.



Obr. 4: Schéma syntézy fenolických kyselin [13]

Nejdříve vede deaminace fenylalaninu a/nebo tyrosinu ke vzniku skořicové a/nebo *p*-kumarové kyseliny. Poté jsou aromatické kruhy skořicové a *p*-kumarové kyseliny hydroxylovány a methylovány za vzniku derivátů např. kyseliny kávové nebo ferulové. Deaminace, methylace a hydroxylace jsou tři základní reakce účastnící se formování fenolických kyselin. Tvorba kyseliny benzoové může být výsledkem degradace postranního řetězce kyseliny skořicové. Hydroxylace a methylace aromatického kruhu kyseliny benzoové mohou vést k dalším derivátům, například k *p*-hydroxybenzoové a protokatechuové kyselině.

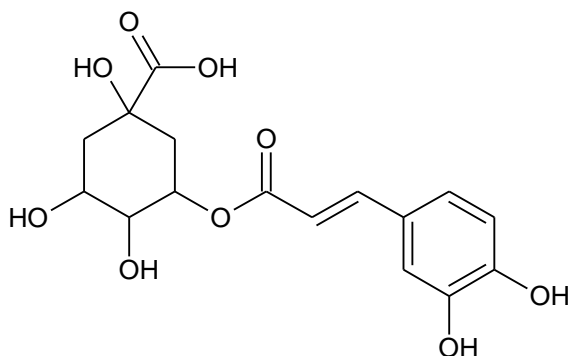
Fenolické kyseliny jsou hojně obsaženy v lidské stravě tak jako flavonoidy, z části jsou obsaženy i v houbách [13].

### 2.1.2.1 Účinky fenolických kyselin na zdraví

Kyselina gallová má kromě astringentních a styptických účinků i bakteriostatické, antioxidační a antineoplastické (působící proti nádorům) vlastnosti. Dále je kandidátem pro léčbu mozkových nádorů, vzhledem ke schopnosti potlačení proliferace a invaze do lidských gliomových buněk. Kyselina *p*-hydroxybenzoová má antioxidační vlastnosti vůči volným radikálům, a také antimikrobiální aktivitu vůči patogenním bakteriím a houbám. Podobnou bioaktivitu má i protokatechuová kyselina včetně inhibice oxidace LDL. Další fenolické kyseliny s příznivými vlastnostmi jsou například kyselina vanilinová, prokázala schopnost

potlačit jaterní fibrózy u chronických jaterních poškození, kyselina syringová, která má antibakteriální a antioxidační účinky a další jako jsou kyselina skořicová, kyselina gentisová, kyselina salicylová nebo také kyselina kumarová [13].

#### 2.1.2.2 Kyselina chlorogenová

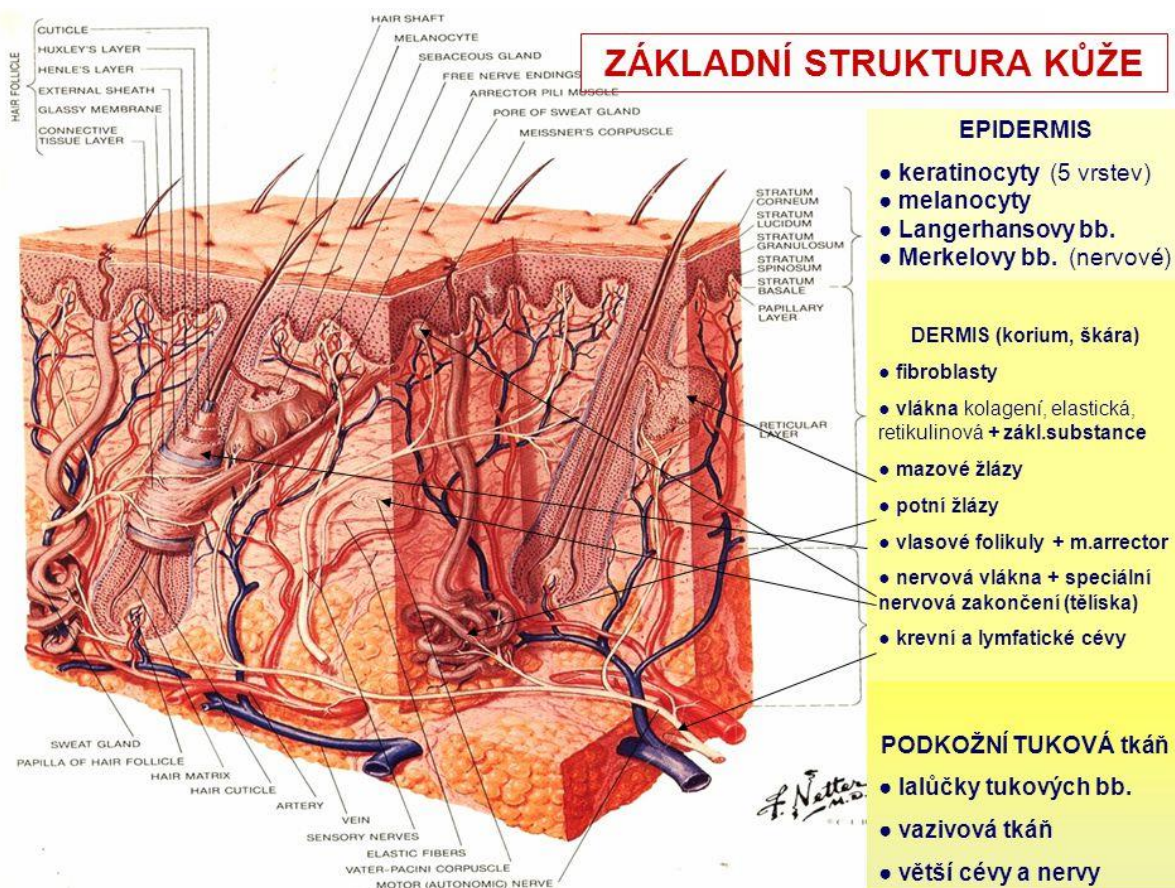


Kyselina chlorogenová, ester kyseliny kávové a chinové, je nejhojněji vyskytující se polyfenolická sloučenina přítomná v mnoha druzích potravin, které denně konzumujeme, jako jsou třešně, jablka, kiwi, artyčoky, lilek, švestky nebo káva. Tato fenolická kyselina má mnoho biologických vlastností, je antibakteriální, protizánětlivá a má antioxidační aktivitu, také je hypoglykemická a hypolipidemická. Kyselina chlorogenová také inhibuje činnost krevních destiček a tím také vznik sraženin, i když přesný mechanismus této inhibice zatím nebyl objasněn [14].

## 2.2 Kůže

Lidská kůže má mnoho funkcí, zejména chrání proti fyzikálním, chemickým nebo biologickým faktorům. Dále se podílí na regulaci vody a elektrolytů pro udržení homeostázy, také plní sekreční roli. Podílí se na vnímání a imunologické odezvě celého organismu. Kůže dospělého člověka zaujímá plochu asi 1,5-2 m<sup>2</sup> a představuje jednu desetinu lidské hmotnosti. Proto poruchy nebo poškození tohoto orgánu mohou být vážnou hrozbou pro zdraví a někdy dokonce i život pacienta [4].

Kůže se skládá ze tří základních částí: epidermis (pokožka), dermis (korium, cutis, škára) a tela subcutanea (subcutis, podkoží) [15].

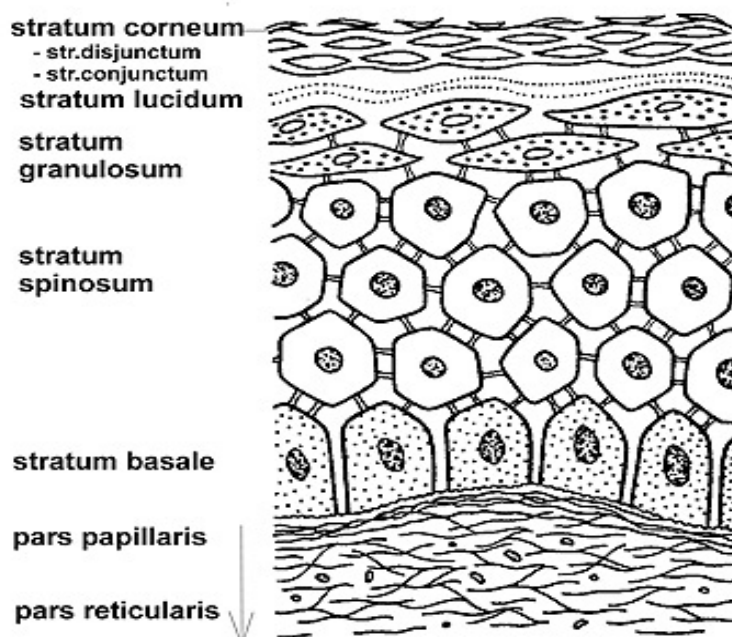


Obr. 5: Stavba kůže [16]

Epidermis odvozená z embryonálního ektodermu, je nej povrchnější a nejtenčí část kůže, zejména její zevní zrohovatělé vrstvy jsou vysoce nepropustné pro vodu a jsou chemicky inertní, tvoří primární bariéru proti mechanickému poškození, vyschnutí nebo průniku mikrobů [17]. Tato vrstva je tvořena vícevrstevným dlaždicovým rohovějícím epitelem, tedy hlavně keratinocyty, dalšími buňkami jsou melanocyty, Langerhansovy a Merkelovy (Dogielovy) buňky. Epidermis můžeme dělit na dalších pět vrstev: stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lucidum a nej povrchnější stratum corneum.

Keratinocyty jsou buňky epidermis, slouží organismu i určitou dobu po svém zániku. Jeden z hlavních úkolů epidermis je vytvoření stratum corneum z mrtvých corneocytů. Proces jejich vzniku trvá na kůži trupu přibližně 28 dní, na kůži hlavy 14 dní. Základy pro keratin nacházíme už v buňkách bazální vrstvy. Dalšími buňkami epidermis jsou melanocyty, mají neuroektodermální původ jsou umístěny pouze v bazální vrstvě epidermis, ve vlasovém folikulu a někdy v koriu. Mají velké jádro a v cytoplazmě jsou přítomny melanosomy, které slouží k syntéze a hromadění melaninu, ten je dále transportován do keranocytů. Langerhansovy buňky vznikají v kostní dřeni a jsou transportovány do kůže. Jejich hlavní

funkcí je prezentace antigenu lymfocytům. Nejjednoduššími hmatovými elementy v epidermis jsou Merkelovy buňky.



Obr. 6: Vrstvy kůže [15]

Dermis je střední vrstvou kůže, převažují zde tři základní druhy buněk: fibroblasty, jsou důležité pro syntézu vazivových vláken, podmiňují vznik čtyř typů vláken: kolagenních, elastických, retikulinových a kotvicích fibrilů, mezi další druhy buněk dermis patří histiocyty a mastocyty.

Tela subcutanea je nejhlubší vrstvou kůže, pochází z mezodermu a je složena převážně z tukové tkáně složené z tukových buněk a z lamelárně uspořádaného řídkého vaziva [15].

### 2.2.1 Absorpční a exkreční činnost kůže

Kůže je v podstatě semipermeabilní membrána, je schopna omezené absorpce a exkrece. Její propustnost je ovlivněna stavem kůže, zejména rohové vrstvy a její hydratace, průnik látek z vnějšího prostředí je dán samozřejmě také charakterem těchto látek [15].

Absorpce se díky vstřebatelnosti hlavně liposolubilních látek využívá při aplikaci léčebných mastí [17]. Z pohledu vstupu chemických látek do organismu je důležitý rozdíl mezi charakterem hydrofobní rohové vrstvy a charakterem ostatních vrstev kůže, které jsou hydrofilní. Hlavní bariérou pro průnik látek z vnějšího prostředí do organismu transdermální cestou je rohová vrstva (stratum corneum). Hydrofilní části pokožky uložené hlouběji mohou být limitující pro vstup lipofilních látek, pokud je rohová vrstva poškozena nebo změněna

nemoci. Dále význam podkoží, nejhlubší vrstvy kůže, jako bariéry z hlediska průniku chemických látek je zanedbatelný [18]. Prostup aktivních látek kůží se může dít více způsoby: trans epidermálně (transcelulárně) tj. skrz buňky, intracelulárně tj. mezibuněčnými prostory, trans folikulárně, přes potní žlázy nebo vlasové folikuly. Trans celulární prostup probíhá podél spojů mezi korneocyty, tím to způsobem mohou absorbovat pouze malé molekuly, které mohou být rozpustné jak v tucích, tak ve vodě. Lipofilní a amfifilní sloučeniny pronikají kůží intracelulárně. Penetrace skrze kožní adnexu (potní a mazové žlázy, nehty, vlasy) je méně důležitá protože, směr sekrečního toku je obrácený k pohybu aktivní látky [4].

Průnik látek kůží je většinou považován za proces pasivní difúze. Někteří autoři se ale domnívají, že vedle pasivní difúze se zde uplatňuje i vliv „nasávání“ látky, jež je vyvoláno podtlakem vznikajícím při odvádění tkáňové tekutiny a krve ze škáry. Průnik chemických látek kůží probíhá v několika stupních, je známo více typů rozdělení různých druhů prostupů. Diembeck a spol. dělí průnik chemických látek na adsorpci a absorpci. Adsorpcí se látka váže pouze ve stratum corneum a je odstraněna s jejími odlupujícími se buňkami, nedostává se tedy do hlubších vrstev kůže a ani do systémové cirkulace. Absorpcí se látka dostává do hlubších struktur pokožky a do škáry, dále prostřednictvím kontaktu mezibuněčného tkáňového moku a cév se může dostat dále do oběhu. Novější popis průniku látky do organismu popisuje OECD a WHO. Podle těchto institucí je absorpce globální termín, který popisuje celou cestu transportu látky z vnějšího prostředí až do lymfatického nebo krevního oběhu organismu. Proto absorpci dále rozděluje na penetraci tj. vstup látky pouze do stratum corneum, permeaci tj. prostup látky do dalších vrstev kůže a na resorpci tj. vstup látky do kožních krevních nebo lymfatických cév [18].

Exkreční funkci mají zčásti potní žlázy a zčásti mazové žlázy. Mazové žlázy jsou vázány na vlasové folikuly a ústí do nich, jsou rozloženy po celém těle, zvláště velké jsou v kůži hlavy, obličeje a hrudníku. Sekrecí kožního mazu se na povrch dostávají lipidy, chrání kůži před účinky vlhka a vysycháním, mají také baktericidní účinky [17]. Kůže také produkuje melanin a keratin [15].

#### **2.2.1.1 Absorpce fenolických látek**

Propustnost sloučenin přes kůži závisí na biologickém faktoru, jako je věk, vitalita kůže, kardiovaskulární funkce a metabolismus jedince, druhým významným faktorem jsou samozřejmě fyzikálně-chemické aspekty sloučeniny, jako jsou rozdělovací koeficient mezi stratum corneum a transportérem, dále pak lipofilita, velikost částic, prostorová struktura molekuly nebo polarita.

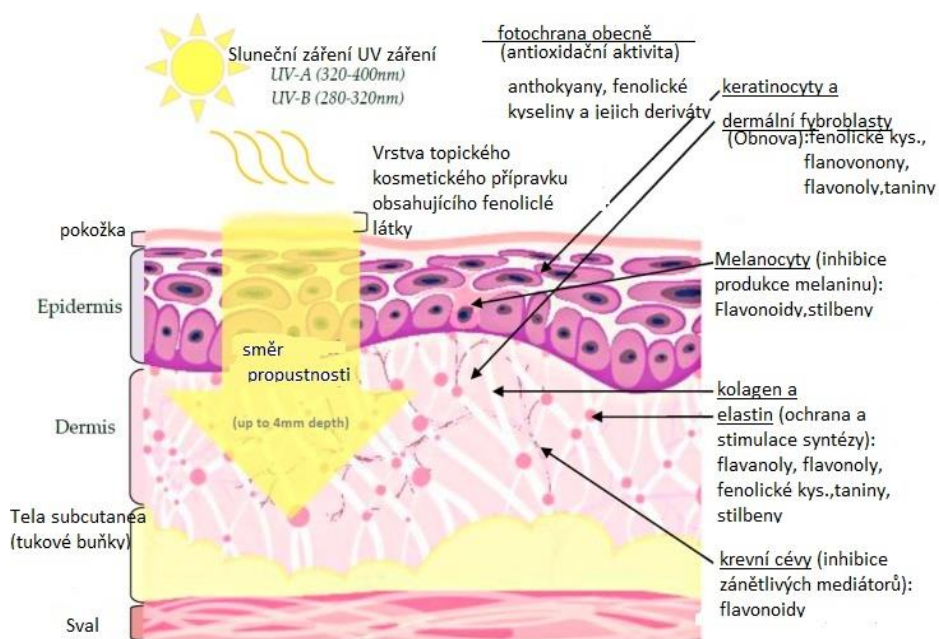


Propustnost fenolických látek kůži závisí na tom, do jaké skupiny sloučenina patří, na molekulové velikosti, struktuře a na tom, jestli se vyskytuje v glykosidické formě nebo jako aglykon. V návaznosti na pronikání pokožkou fenolických látek mohou podstoupit buď enzymatické reakce nebo neenzymatické reakce.

Nicméně, vzhledem k tomu, že kůže působí jako bariéra, většina účinných látek podávaných topicky na kůži, má nízkou přirozenou propustnost. Abychom zvýšili prostupnost těchto účinných látek, byla vyvinuta řada fyzikálních metod (elektromechanické, iontoforézy nebo okluzivní obvazy) a chemických metod, zahrnující přidání chemických sloučenin, působících jako přenašeče, tyto látky způsobují reverzibilní narušení bariérové funkce, což vede ke zvýšení její propustnosti.

V případě fenolických látek byly vyvinuty nové postupy pro zlepšení jejich penetračních vlastností, jde o postupy enkapsulace látek do liposomů, fitosomů, transferosomů, nanoemulzí, nanočástic, mikroemulzí, nanokrystalů. Materiály používané v kosmetice a farmacii mohou být nosiči fenolických látek s přesným působením látky přímo v místě podráždění pokožky [4].

## 2.2.2 Stárnutí kůže



Obr. 7: Vlivy na kůži [19]

Pokud se podíváme na stárnutí z hlediska fyziologie kůže, pak zjistíme, že životnost epidermálních buněk se se zkracuje, ale regenerační schopnost epidermis zůstává zachována. Povrchový ochranný emulzní film je závislý na produkci mazu a potu, termoregulační mechanismy zase na změnách průsvitu kožních cév a činnosti potních žláz. Při stárnutí kůže

dále dochází k alternaci funkce T-lymfocytů, a tím ke snížení odolnosti vůči bakteriálním, mykotickým a virovým infekcím. Změny v jednotlivých vrstvách kůže:

- 1) Epidermis – zde dochází ke zmenšení tloušťky, hlavně ve stratum spinosum. Také dochází k rozšiřování mezibuněčných štěrbin, dermoepidermální soudržnost je také snižována, proto je stárnoucí kůže více náchylná k tvorbě puchýřů.
- 2) Dermis – zde dochází ke snižování počtu kolagenních vláken, klesá jejich mechanická pevnost a odolnost a také se mění jejich uspořádání. Elastická vlákna degenerují, hrubnou a zkracují se.
- 3) Tela subcutanea – vazivové přepážky mezi lalůčky tuku atrofují a tukové tkáně ubývá. Spolu se změnami vláken v dermis to přispívá k uvolnění kůže, která se skládá do vrásek. Tuk obsahuje více cholesterolu, což přispívá ke žlutavém zbarvení kůže [15].

Z kosmetického hlediska si vývojově dospělá kůže individuálně různou dobu uchovává svůj, alespoň povrchově nezměněný vzhled. První známky vzhledového stárnutí jsou vrásky, ty ale nemusejí být jednoznačným ukazatelem biologického stárnutí, na jejich vzniku se podílí řada vlivů např. životní prostředí, výživa, alkohol, kouření nebo genetika. Příčinnou vrásek je ztráta turgoru a elasticity kůže, tyto změny jsou převážně důsledkem sluneční expozice, ta vyvolává na nechráněných místech kůže degeneraci vazivové složky. Které vlnové délky a jaká míra expozice jsou rozhodující není dosud příliš objasněna, jasné ale je, že těmito důsledkům solární expozice se dá předejít jedine soustavnou a cílevědomou ochranou. Ztráta elasticity kůže je doprovázena také poruchou pigmentace a přesuny pigmentu, ztenčením pokožky a tím zviditelněním kapilárních kliček a hrubnutím kožního reliéfu. Histologický obraz změn na místech vystavených sluneční expozici je celkem specifický a od histologického obrazu staré kůže rozdílný. Histologický obraz staré kůže je charakteristický hlavně regresivními zánikovými změnami, a to úbytkem jednotlivých vrstev kůže, úměrně ve všech vrstvách od epidermis až po podkožní tuk. Dochází také ke změně barvy kůže, jejímu svraštění, ztenčení, atrofii mazových a potních žláz, tím dochází k dehydrataci jejího povrchu [19].

#### **2.2.2.1 Obnovení kožních buněk**

Epidermální kožní buňky mají schopnost kontinuální sebe obnovy a náhrady mrtvých buněk. Odhaduje se, že lidské epidermální buňky se obnoví za 40-56 dní. Bohužel tato schopnost sebe obnovy buněk rapidně klesá se zvyšujícím se věkem. Nicméně tento proces může být zpomalen nebo dokonce zvrácen některými biologicky aktivními látkami, mezi něž patří právě fenolické látky. Také bylo dokázáno, že mnoho polyfenolů z extraktů rostlin vykazuje inhibiční aktivitu

vůči kolagenázám a elastázám, což usnadňuje udržování správné struktury pokožky. Podle výzkumu Wittenauera a spol. by mohly být fenolické sloučeniny stanovené v hroznovém výlisku z bílého vína užitečné v kosmetických přípravcích v důsledku jejich inhibičních vlastností na matrix metaloproteináz. Mezi tyto fenolické sloučeniny patří kyselina gallová, kaftarová a glykosidy kvercetinu. Bohužel použití některých polyfenolů v kosmetice může být omezeno kvůli jejich vysoké molekulové hmotnosti a nižšímu potenciálu propustnosti přes vrstvy kůže.

#### **2.2.2.2 *Produkce melaninu***

Melanin je syntetizován v melanosomech, jsou to organely lokalizovány v melanocytech. Základní funkcí melaninu je pigmentace kůže. Poté co je syntetizován v melanocytech je transportován do keratinocytů přes dendrity. Pigment je odvozen od aminokyseliny tyrosinu přes několik oxidačních reakcí se zapojením enzymu tyrosinázy. Melanin má významnou úlohu v ochraně proti UV záření, je schopen absorbovat 50–75 % UV záření. Nic méně, nadměrná produkce melaninu může být způsobena jak expozicí UV záření, tak léky, chemikáliemi nebo chorobnými stavy, což podmiňuje dermální poruchy. Hyperpigmentace je také nevyhnutelně spojena se stárnutím.

Testy provedené na buněčných kulturách ukázaly, že fenolické sloučeniny účinně potlačují syntézu melaninu. Inhibice melaninu se předpokládá hlavně prostřednictvím potlačení funkce tyrosinazy. Flavonoidy a fenolické kyseliny mají díky aromatickým purinovým kruhům podobnou strukturu jako tyrozin, takže mohou být oxidovány tyrozinázou, stávají se substrátem a zastavují melanogenezi [4].

### **2.3 Možnosti měření transdermální absorpce**

K testování absorpce chemických látek kůži se mohou využívat tyto metody:

- 1) Pokus in vivo na člověku nebo zvířeti
- 2) Pokus in vitro na lidské, zvířecí nebo syntetické kůži
- 3) Pokus in vitro na syntetické membráně (není to kůže)
- 4) Modelování absorpce in silico

Testy na zvířatech prokázaly, že absorpce látek přes kožní membránu in vitro bývá vyšší než absorpce in vivo. Ale směrnice Evropské Unie, které jsou v platnosti od roku 2009 zakazují

používání zvířat pro testování akutních účinků kosmetických přípravků a směrnice platná od roku 2013 zakazuje testování chronické toxicity, reprodukční toxicity a toxikokinetiky kosmetických přípravků na zvířatech. Tato směrnice velmi ovlivnila rozvoj metod testování látek na kůži in vivo.

Možností typů absorpčních membrán pro testy in vitro je více, mezi nejlepší patří lidská kůže. Vzorky se získávají buď z tkáňové banky nebo od živých dárců, většinou při chirurgických operacích, nejčastěji se používá kůže ze zad, břicha, hrudníku a boku. Absorpce chemických látek přes kůži je poté ovlivňována samozřejmě věkem dárce, jeho pohlavím, hydratací kůže, místem odběru a prostředím, kde je experiment prováděn. Další možností membrány může být kůže prasečí nebo opičí, jsou lidské kůži totiž velmi podobné svou anatomií, fyziologií a chemickým složením. Nejčastěji se používá kůže prasečí, odebírá se ze zad, břicha a boků, velmi vhodnou možností je použití ušního boltce prasete, je totiž svou anatomií nejvíce podobný lidské kůži. Kůže jiných zvířat běžně používaných k laboratorním účelům není příliš vhodná, dost se liší svou anatomií a chemickým složením od lidské kůže. Za další vhodnou možnost membrány můžeme považovat kůže uměle vytvořené, kůže je vypěstována z keratinocytů in vitro. Bohužel tyto membrány nedosahují vlastností přirozené kůže, proto není doporučována k finálnímu testování humánních a veterinárních topických přípravků. Dá se však použít k orientačnímu testování látek.

Lidskou i zvířecí kůži můžeme použít v plné tloušťce tj. 500-1000  $\mu\text{m}$ , tyto vzorky pak obsahují stratum corneum, epidermis a dermis. Můžeme také použít dermatomovanou kůži, tato kůže je seříznuta na tloušťku 200-500  $\mu\text{m}$ , pak obsahuje rohovou vrstvu (stratum corneum), epidermis a pouze svrchní část dermis. Další variantou může být použití pouze epidermis, ta je oddělena tepelně, chemicky nebo enzymaticky, bazální membrána může být nebo nemusí být zachována. Poslední možností je použití pouze samotného stratum corneum, to se připravuje z epidermis, po natrávení trypsinem.

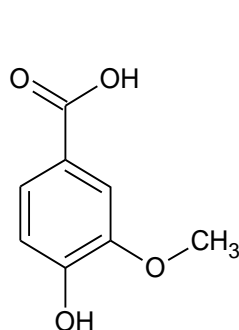
Pro testování by měla být optimálně kůže čerstvá asi 1-2 dny od odběru, tato kůže by měla mít zachovaný enzymatický systém, i když k částečné autolýze dochází již v okamžiku odběru. A protože je zde alespoň částečně zachovaný enzymatický systém tuto kůži můžeme použít nejen pro testování transdermální absorpce látek, ale také pro testování jejich dermálního metabolismu. Metabolická aktivita, teda životnost vzorku klesá s dobou skladování. Při skladování v chladu klesne během prvního dne aktivita asi na polovinu, do osmého dne pak zůstává stejná. Po osmém dni pokles pokračuje. Dá se používat i mražená kůže, kdy se vzorky i hned po odebrání zmrazí. Tato kůže nemá zachovaný aktivní enzymatický systém a je

anatomicky poškozena krystalizací vody, ale protože rohová vrstva je bezvodá, tak je poškozena minimálně. Ve srovnání s čerstvou kůží, zde dochází k rychlejšímu průtoku testované látky. Přesto je tento druh kůže oficiálně doporučován pro testování prostupnosti látek, výhodou zde může být možnost dlouhé doby skladování, proto je také kůží nejčastěji využívanou. Pak je ale nutno brát v úvahu, že s dobou skladování kůže roste i její míra propustnosti. Další možností může být použití také kůže sušené, tato kůže je méně anatomicky poškozena než mražená, ale před použitím je ji třeba opětovně hydratovat. Tato kůže se používá pouze výjimečně.

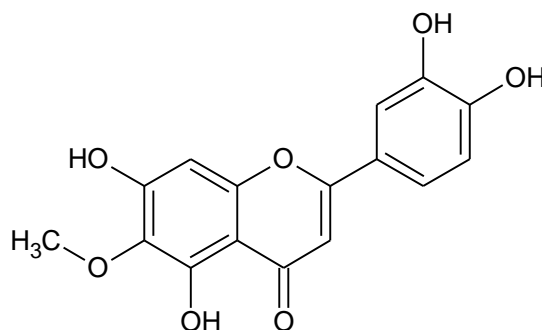
Kůže, která je určena k odběru, nesmí být viditelně poškozena a tetována. Povrchová úprava je pouze omytí vodou a mýdlem bez použití dezinfekčních prostředků, což může být problém při odběru kůže po chirurgickém zákroku. Pokud používáme prasečí kůži, nesmí být na jatkách spařena. Na odebrané kůži je pak nutné odstranit viditelné chlupy a podkoží, aby nám zůstala asi 1 mm silná vrstva pokožky a škály [18, 20].

## 2.4 Současný stav studia transdermální absorpce fenolických látek

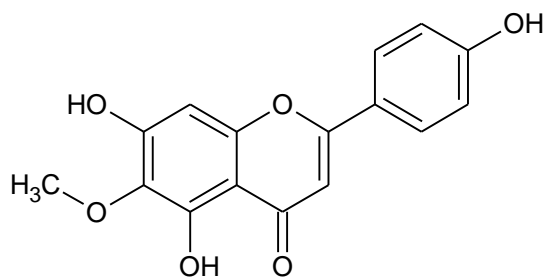
Ve studii [21] byla testována transdermální absorpce tří fenolických látek v extraktu z *Clerodendrum petasites* S. Moore, která je hojně používána v thajské medicíně. Měřenými fenolickými látkami byly kyselina vanilinová, nepetin a hispidulin. Testy in vitro byly provedeny na prasečí dermatomované kůži, uchovávané mražením, na Francových celách. Extrakt z rostliny byl zapracován do krému (olej ve vodě) a pleťové vody. Analýza receptorové tekutiny byla poté prováděna na HPLC. Odběr vzorků se prováděl po 6 hodinách. Výsledky absorpce těchto tří sloučenin ukazují, že jsou všechny schopny projít kůží, takže mohou být tyto sloučeniny považovány za potenciální účinné látky v tradiční thajské medicíně využívané pro léčbu široké škály kožních onemocnění .



k.vanilinová

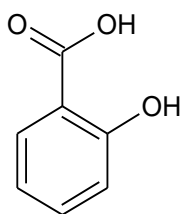


nepetin

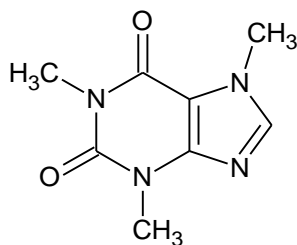


hispidulin

Jiná studie [22] provedená Muhammedem Faquir a spol. nám podává výsledky o možnostech zlepšení prostupu kyseliny salicylové (hydrofobní) a kofeinu (hydrofilní) pomocí přírodních látek. Bylo testováno pět přírodních látek jako akceleraantů, hydroxycitonelal, limonen-1,2 epoxid, terpinylacetát, kyselina *p*-kumarová a kyselina tranfelurová. Pro testy in vitro byla použita prasečí kůže hodinu po odběru a byla dermatomovaná na tloušťku 500  $\mu\text{m}$ . Byly použity Franzovy cely, vzorky receptorové tekutiny byly odebírány po patnácti minutách až do 120 minuty a pak vždy po hodině, poslední vzorek byl odebrán po 24 hodinách. Výsledky měření byly následující, dermální absorpce kofeinu byla významně vyšší po dobu celých 24 hodin u terpinylacetátu a limonenu 1,2 epoxidu, tento výsledek se dá vysvětlit na základě relativně malé molekulové hmotnosti těchto terpenů a jejich chemické struktury, větší terpeny by hůře prostupovaly. Významně nižší byla absorpce kofeinu u kyseliny *p*-kumarové a tranfelurové, v tomto případě zůstal kofein na povrchu kůže nebo ve stratum corneum (adsorpce), srovnáváno s ethanolem. U kyseliny salicylové byly výsledky poněkud jiné, nevýznamnější modulace transdermální absorpce byly pozorovány u hydroxycitonelalu a limonenu 1,2 epoxidu, opět srovnáváno s ethanolem. Těto výzkum nám demonstuje rozdílné účinky přírodních látek jako akceleraantů na hydrofilní a hydrofobní látky.

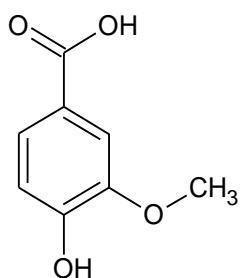


Kyselina salicylová

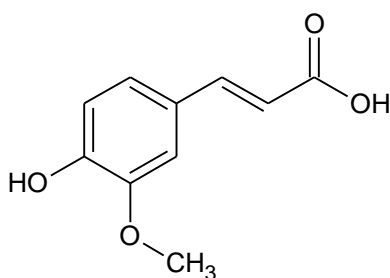


kofein

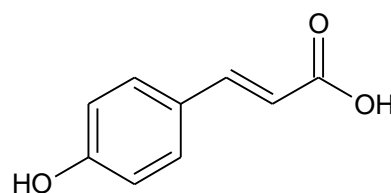
Další ze studií [23] zpracovává téma uvolňování fenolických kyselin a vanilinu z propolisu v polotvrdé formulaci a jejich pronikání do lidské kůže in vitro. Propolis byl zpracován do třech kosmetických forem, a to do masti, krému voda/olej a hydrogelu, srovnáváno s vodným extraktem propolisu. Transdermální absorpce byla sledována u kyseliny kávové, vanilinové, kumarové, ferulové a u vanilinu. In vitro studie byla provedena na lidské kůži získané od kavkazských žen ve věkovém rozmezí 25-40 let, vzorky byly získány z ústavu plastické a rekonstrukční chirurgie, dále byly skladovány v mazáku, ne déle než 6 měsíců před použitím. Test byl prováděn s plnou tloušťkou lidské kůže na difuzních celách typu Bronaugh. Experiment probíhal 24 hodin, poté byly jednotlivé vrstvy kůže odděleny, stratum corneum, epidermis a dermis, byly extrahovány a pak analyzovány. Výsledky prokázaly, že po 8 hodinách působení se z hydrogelu uvolnilo téměř celé množství fenolických látek, ale z masti se uvolnilo pouhých 5 % a z krému voda/olej 22 % fenolických látek. Aplikace vodného extraktu propolisu na kůži prokázala, že všechny studované fenolické kyseliny jsou schopny proniknout do/přes epidermis do dermis. Po 24 hodinách obsahoval epidermis asi 5 % kyseliny kumarové a ferulové, dermis 4 % kumarové kyseliny a 6 % ferulové kyseliny. Vanilin a kyselina vanilinová poměrně snadno pronikly před epidermis do dermis, v epidermis bylo asi 1-2 % a v dermis 11 % a 8 % vanilinu a kyseliny vanilinové. Kyselina kávová byla stanovena na 4 % v epidermis a v dermis nebyla nalezena. Tyto rozdíly ve výsledcích by mohly být připisovány různé lipofilite zkoumaných látek. Lipofilnější sloučeniny jako je kumarová, ferulová a kávová kyselina se zadržely spíše v epidermis, naproti tomu vanilin a kyselina vanilinová, které jsou méně lipofilní prostoupily až do dermis. Ve srovnání s vodným extraktem propolisu bylo zaznamenáno menší množství fenolických kyselin a vanilinu v epidermis a dermis při použití hydrogelu. Hydrogel podpořil prostup vanilinu a kyseliny vanilinové do dermis, zatím co kumarová kyselina byla nalezena pouze v epidermis a ferulová a kávová nebyly determinovány ani v epidermis, obě tyto sloučeniny dobře pronikaly z vodného extraktu propolisu, jak bylo uvedeno výše. Prostup fenolických kyselin a vanilinu z emulzních systémů byl srovnatelný s vodným extraktem propolisu, pouze absolutní množství fenolických látek bylo asi dvakrát nižší v tomto systému. Pouze v případě kyseliny vanilinové byly zaznamenány velké rozdíly v penetraci mezi krémem v/o a mastí. V případě kyseliny kávové z masti nepronikla ani do epidermis z krému o/v pronikla do epidermis, ale ne do dermis. Výsledky studie přispívají k vývoji kosmetických emulzních systémů s ohledem na průnik obsažených látek přes kůži a následnou inkorporaci propolisových extraktů do vhodných kosmetických formulí.



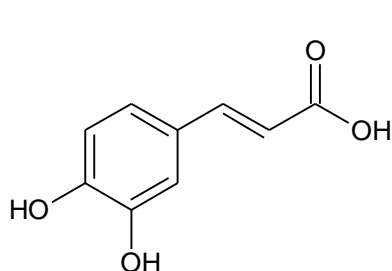
Kyseliny vanilinová



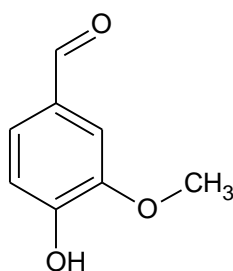
Kyseliny ferulová



Kyselina kumarová



Kyselina kávová



Vanilin

## 2.5 Studium možností HPLC pro měření rutinu a kyseliny chlorogenové

Ve studii [24] byl určován rutin, kyselina chlorogenová a mimo jiné také kyselina rozmarýnová v různých druzích jednoděložných rostlin rodu *Marantaceae*. Bylo pro detekci extraktů z těchto rostlin použito HPLC, analýza byla provedena isokraticky s 45% MeOH / 0,01% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> na koloně hypersil ODS (5 μm, 280mm x 40 mm) při průtoku 0,8 ml/min při injekci zředěného extraktu 20 μl. Eluční sloučeniny byly detekovány při 333 nm a identifikovány a kvantifikovány podle autentických standardů.

Jiná studie [25] provedená Maoem a spol. analýzy tabákových listů sklizených v roce 2011 v Číně pro zjištění kyseliny chlorogenové, rutinu a skopoletinu se prováděla mimo jiné i na HPLC. Použity byly 2 ml extraktu připraveného z 10 mg vzorku s 20 ml 50% methanolu a vody. Chromatografický systém 1260 infinite (Agilent technologies, USA) byl použit k detekci výše uvedených polyfenolických látek. Použitá kolona byla C 18 (Symmetry 5 μm, 250 mm x 4,6 mm, Waters, USA), detektor s diodovým polem (G4212B, Agilent Technologies, USA), byly použity pro separaci a detekci v tomto pořadí. Mobilní fáze byla složena ze směsi voda-methanol-kyselina octová v roztoku A (88:10:2, v/v/v) a v roztoku B (10:88:2, v/v/v). Šlo o gradientovou eluci, začínající od A: B = 10:0, následováno lineárním



gradientem A: B = 8:2 v 16,5 min., A: B = 2:8 ve 30 min. a pak to se udržovalo až do konce analýzy. Průtok byl 1,0 ml/min, objem nástriku 10  $\mu$ l a detekční vlnová délka 340 nm.

Výzkum [26] antidiabetického působení rutinu, isokvercetin a kyseliny chlorogenové, obsažených v listech *Morus alba* byl proveden z části na HPLC. Konkrétně bylo HPLC použito ke kvantitativnímu stanovení UV-aktivních a potenciálně antidiabetických složek, tedy kyseliny chlorogenové, rutinu a isokvercetin. Analýza byla provedena gradientovým systémem na přístroji Jasco PU2080, čerpadla byla připojena k MD-2010 Plus s detektorem s diodovým polem Jasco (DAD), kolona Zorbax SB C-18 (5 $\mu$ m, 4,6 mm x 250 mm) byla použita s vodným acetonitrilovým gradientem (10% plynulé zvyšování až na 23 v 17 min, za udržování stejného poměru do t = 25 min a pak navrácení do stejného složení) při průtoku 1ml/min. Voda i acetonitril obsahovali 0,05 % TFA. Data byla získána na 210 až 400 nm a každá sloučenina byla určena na UV absorbančním maximu  $\lambda$  = 353,0 nm (rutin a isokvercetin),  $\lambda$  = 326,3 nm (chlorogenová kyselina). Byly měřeny tři nezávislé vzorky, které byly rozpuštěny v 1,00 ml 50% methanolu, dávkováno bylo 10  $\mu$ l.

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část diplomové práce zahrnuje přípravu standardních roztoků obsahujících účinné látky, které jsou následně stanovovány v extraktu z bezových větviček, přípravu kožních membrán a následné sestavení aparatury difuzních Franzových cel. Dále tato práce obsahuje identifikaci a kvantifikaci daných absorbovaných látek z akceptorové tekutiny.

#### 3.1 Použité chemikálie

Rutin hydrát min. 95%	Sigma Aldrich, Steinheim, Německo
Kyselina chlorogenová	Sigma Aldrich, India
Chlorid sodný min. 99,5%	LACH-NER s.r.o.; CAS: 7647-14-
Methanol pro HPLC, min. 99,9%	SIGMA-ALDRICH, Steinheim
Kyselina mravenčí 98%	Lach-ner s.r.o., Neratovice, ČR
Ethanol absolute	SIGMA-ALDRICH, Steinheim
Deionizovaná voda	FCH VUT Brno, ČR

#### 3.2 Použité přístroje

kapalinový chromatograf (HPLC)	LC-10AD Shimadzu, Japonsko
pumpa HPLC	GT-104 Shimadzu, Japonsko
Odplyňovač HPLC	FCV-10AL Shimadzu, Japonsko
DAD detektor HPLC	SPD-M10AVP Shimadzu, Japonsko
magnetické míchadlo	FISHER
digitální váhy	ScalTec SPB 42
chladnička	Liebherr
ultrazvuková lázeň	Kraintek, Slovenská republika
Software pro HPLC	CLASS-LC10

#### 3.3 Další pomůcky a příslušenství

Franzova cela	SES GmbH-Analysesysteme
Syntetické membrány (0,23 µm, 0,40 µm)	Pragopor 8; Pragochema spol.s.r.o.

Jehly	Santiago
Injekční stříkačky	Nromject, Německo, 5 ml
Kolona (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Supelcosil LC-18-DB
Scalpel	SURGEON
Celulózové mikrofiltry (0,45 µm)	Chromservis, ČR

### 3.4 Příprava zkušebních roztoků pro transdermální absorpci

Zkušební roztoky zvolených látek sloužily k zjištění jejich tendence prostupovat zvolenými membránami a k stanovení množství těchto látek absorbovaného kůží.

*Zkušební roztok rutinu:* roztok rutinu o koncentraci 0,1 g/l byl připraven rozpuštěním 0,01 g rutinu ve 100 ml ethanolu a kvantitativně převeden do 200ml odměrné baňky. Roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

*Zkušební roztok kyseliny chlorogenové:* roztok kyseliny chlorogenové o koncentraci 0,1 g/l byl připraven rozpuštěním 0,01 g kyseliny chlorogenové v destilované vodě a kvantitativně převeden do 100ml odměrné baňky. Roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

*Směsný zkušební roztok rutinu a kyseliny chlorogenové:* směsný roztok rutinu a kyseliny chlorogenové byl připraven rozpuštěním 0,1 g kyseliny chlorogenové ve vodě a 0,005 g rutinu v asi 2 ml ethanolu, poté byly kvantitativně převedeny do 100ml odměrné baňky a roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

### 3.5 Příprava standardních roztoků pro HPLC

Standardní roztoky sloužily pro ověření retenčních časů daných látek při separaci v nastavené vlnové délce.

*Standardní roztok rutinu:* roztok rutinu o koncentraci 0,05 g/l byl připraven rozpuštěním 0,005 g v mobilní fázi, kvantitativně byl převeden do 100ml odměrné baňky a doplněn po rysku mobilní fází.

*Standardní roztok kyseliny chlorogenové:* roztok kyseliny chlorogenové o koncentraci 0,1 g/l byl připraven rozpuštěním 0,01 g kyseliny chlorogenové v mobilní fázi, následně byl kvantitativně převeden do 100ml odměrné baňky a doplněn po rysku mobilní fází.

*Směsný standardní roztok kyseliny chlorogenové a rutinu:* roztok byl připraven smícháním 1 ml standardního roztoku rutinu o koncentraci 0,05 g/l a 9 ml standardního roztoku kyseliny chlorogenové o koncentraci 0,1 g/l.

### **3.6 Příprava zásobního roztoku chloridu sodného**

Pro přípravu fyziologického roztoku o koncentraci 0,15 M bylo rozpuštěno 0,88 g NaCl ve 100 ml deionizované vody. Tento roztok byl použit jako akceptorová tekutina ve Franzových celách. Na každé měření byl připraven čerstvý.

### **3.7 Příprava extraktu z bezu černého**

Extrakt z bezu černého byl pro naše účely připraven paní Ing. Barborou Hohnovou Ph.D., která jej připravila metodou PHWE, tato metoda byla vyvinuta na Ústavu analytické chemie AV ČR Brno, kde byla příprava také realizována.

Nejdříve byla připravena tzv. patrona, která byla následně umístěna do extraktoru. Nerezové patrony měli objem 1 l, byly utěsněny fritou, na níž byl nasypán inertní materiál v podobě skleněných kuliček o velikosti 500-700 µm, na tento inertní materiál bylo nasypáno 1,2 g vzorku větviček bezu černého, a na ně byl poté opět navrstven inertní materiál. Extrakční proces probíhal ve třech cyklech po pěti minutách při 80 °C a tlaku 15 MPa. Mezi jednotlivými cykly byl extrakt proplachován dusíkem vždy 20 s, po ukončení extrakce pokračovalo ještě 2 minuty probublávání dusíkem. Jako extrakční rozpouštědlo sloužila horká voda o teplotě 80 °C, aby nedocházelo k oxidaci materiálu byla voda probublávána heliem. Získaný extrakt byl převeden do 50ml odměrné baňky a doplněn po rysku extrakčním rozpouštědlem. Postup přípravy byl převzat z práce [27].

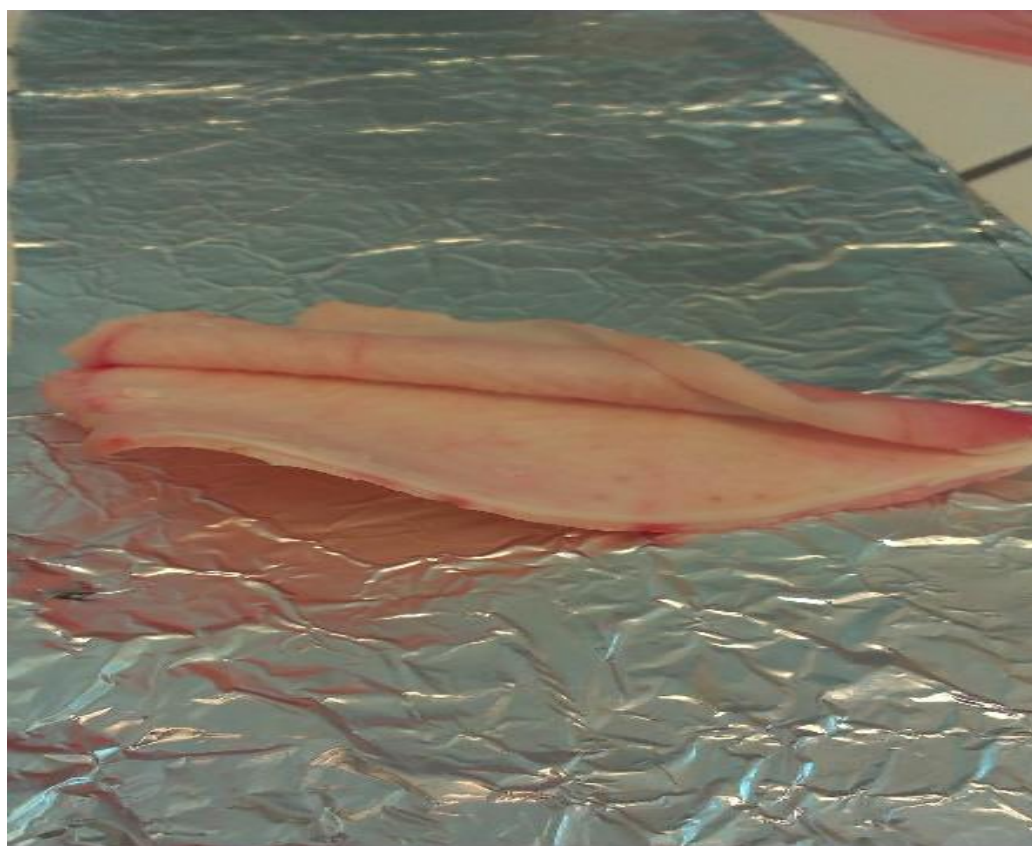
### **3.8 Příprava kožních membrán**

Pro testy in vitro na Franzových celách byly použity kožní membrány z prasečích uší. Uši byly získány z MIKROFARMA s. r. o. Údolní 567/33, 602 00 Brno, byly tepelně neošetřeny, neporušeny a netetovány. Zpracovány a použity byly max. do dvou po odběru.

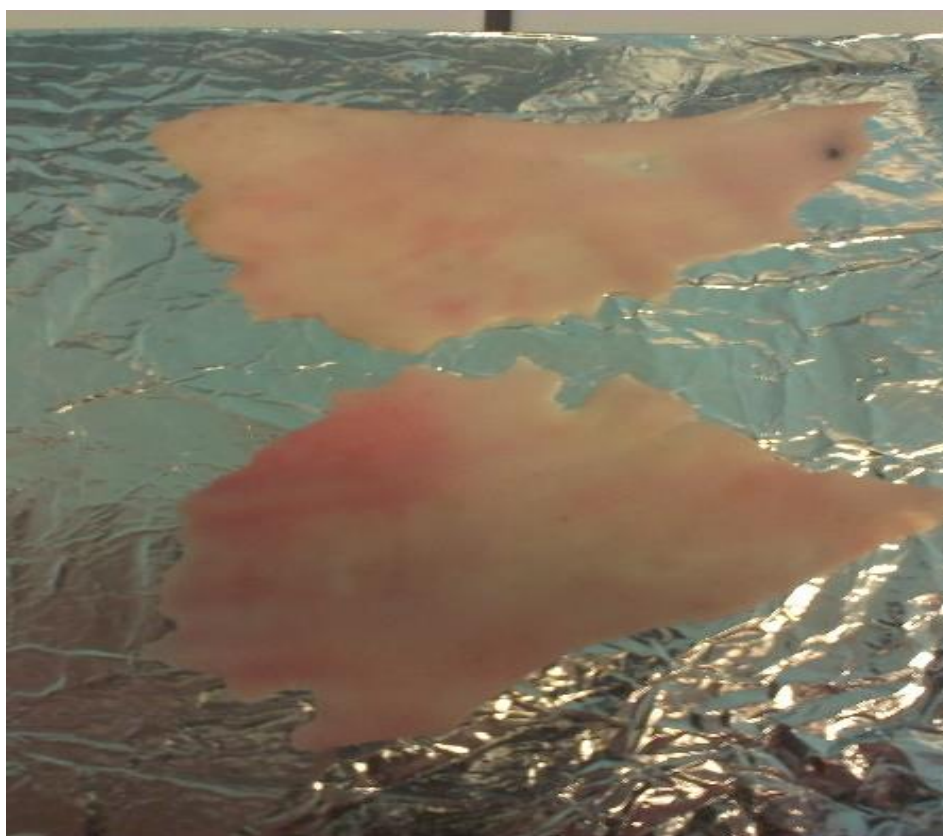
Kůže byla použita v plné tloušťce, ucho bylo seříznuto ručně pomocí skalpelu, co nejpečlivěji byla oddělena tuková tkáň a chrupavka, tak abychom získali co nejrovnější a nejdokonalejší kožní membránu se zachovaným epidermis a dermis. Membrány nebyly zmrazeny ani sušeny, byly použity za čerstva, před použitím byly pouze pečlivě odchlupeny a omyty destilovanou vodou, poté osušeny buničinou.



Obr. 8: Nezpracované čerstvé prasečí ucho



Obr. 9: Příprava membrány



Obr. 10: Již připravené membrány

### 3.9 Difuzní cely

Studium in vitro prostupnosti zvolených látek přes kůži bylo realizováno prostřednictvím Franzových difuzních cel, tedy vertikálních difuzních cel. K dispozici jsme měli 2 tyto aparatury.

Nejdříve bylo nutné styčné plochy darovací i přijímací komory namazat inertní silikonovou pastou na zábrusy, aby následně položená membrána dobře přiléhala k oběma styčným plochám. Poté jsme vložili dovnitř cely magnetické míchadlo, položili membránu mezi dávkovací a přijímací komoru a opatrně, tak abychom ani s jednou částí Franzovy cely nepohnuly jsme tyto 2 části přichytili svorkou. Takto sestavenou aparaturu jsme umístili na magnetické míchadlo a pomocí dlouhé jedly jsme naplnili akceptorovou komoru 20 ml 0,15 M fyziologického roztoku, bylo nutné dlouhou jehlu prostrčit až doprostřed akceptorové komory a poté ji pomalu celou naplnit, tak aby se nám těsně pod membránou nevytvořily žádné bublinky, které by mohly ovlivnit prostup dané látky membránou.

Na takto připravenou aparaturu jsme dávkovali asi 5 ml vzorku, shora do darovací (donorové) komory. Postupně jsme dávkovali všechny zkušební roztoky i extrakt z bezu černého, na syntetické membrány 0,23  $\mu\text{m}$ , 0,40  $\mu\text{m}$  a následně i na kožní membránu. V případě naší studie jsme s ohledem na zkoumané látky, které velmi rychle na vzduchu oxidují, zvolili experiment s tzv. nekonečným dávkováním, takže jsme na závěr po nadávkování vzorku překryli donorovou komoru parafilmem a hliníkovou folií. Regulace teploty vnějšího pláště nebyla využita, všechny experimenty probíhaly za laboratorní teploty. Dále pak, všechny experimenty jsme prováděli dvakrát, jak přes syntetické membrány, tak přes kůži.



Obr. 11: Sestavená aparatura Franzovy cely se syntetickou membránou

### 3.9.1 Odběr vzorků

Difuzní aparatura byla sestavena podle výše uvedeného postupu a každý vzorek byl odebírán z přijímací komory Franzovy cely pomocí dlouhé jehly, ta byla prostrčena až doprostřed objemu cely, odebírání proběhlo vždy 3krát, po 30 min, po 1 hodině a po 24 hodinách. Byl odebrán asi 1 ml vzorku, který byl poté umístěn do nádobky Eppendorf a uchováván v mrazáku až do analýzy, odebrané množství bylo následně doplněno čerstvým fyziologickým roztokem, opět pomocí dlouhé jehly.

### 3.10 Předpoklady míry absorpce vybraných látek přes kůži

S ohledem na stavbu kožní membrány a typy fenolických látek, můžeme podle některých chemických nebo fyzikálních vlastností předpokládat, jakou měrou budou látky absorbovat přes biologickou membránu.

Protože se transdermální prostup látky považuje spíše za pasivní difúzi, řídí se tento proces prostřednictvím Fickova zákona: Tok látky membránou je limitujícím faktorem pro rychlost prostupu a je přímo úměrný rozdílu koncentrací látky na opačných stranách membrány. V oboru transdermální absorpce je běžný zápis Fickova zákona takový:  $J_{ss} = Kp \cdot C_0$ , Kde:  $J_{ss}$  je tok látky membránou v ustáleném stavu ( $\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ),  $Kp$  je pak permeační koeficient pro danou látku o dané koncentraci a v daném nosiči ( $\text{cm}/\text{h}$ ) a  $C_0$  je koncentrace látky v nosiči. Permeační koeficient slouží právě k předpovědi míry absorpce látek. Tato teoretická předpověď, ale v práci není využita.

Dalším faktorem ovlivňujícím absorpci látky je rozdělovací koeficient mezi n-oktanol a vodou, bývá většinou udáván v logaritmické formě  $\log K_{ow}$ , je to podíl dvou koncentrací, je to bezrozměrná veličina závislá na pH, teplotě, iontové síle, velikosti povrchu molekuly, jejím nábojem atd. Obecně menší molekuly bez dipólového momentu a atomy bez náboje mívají vyšší hodnotu rozdělovacího koeficientu [28]. Podle autorů práce [29] budou nejlépe prostupovat látky s  $\log K_{ow}$  mezi 1-3, u látek, které mají tuto hodnotu nižší nepředpokládají vstup do lipofilní vrstvy kůže, naopak látky s vyšší hodnotou rozdělovacího koeficientu vstoupí do stratum corneum, ale již neprostoupí přes hydrofilní části kůže.  $\log K_{ow}$  pro rutin je - 2,02 [30] a pro kyselinu chlorogenovou -1,01 [31]. Z těchto hodnot můžeme usuzovat, že zvolené látky nebudou příliš ochotně prostupovat kůží, pokud vůbec prostoupí stratum corneum.

Jak byla v přechodném odstavci naznačeno další z možných ukazatelů prostupnosti kůží látky může být její hydrofobita a hydrofilita, protože nejhornější vrstva pokožky tedy stratum corneum má hydrofobní charakter může se stát, že příliš hydrofilní látky nevstoupí do této svrchní vrstvy kůže, zatím co hydrofobnější látky, což je v našem případě rutin, by měli snadněji prostupovat. Naproti tomu, hlubší vrstvy pokožky mají charakter spíše hydrofilní, zde by se mohl rutin naadsorbovat a neprocházet skrz membránu, naopak kyselina chlorogenová by měla projít snáze.

Jedením z dalších aspektů může být velikost částic, autoři práce [32] předpokládají, že nejvyšší míru prostupnosti budou vykazovat látky s molekulovou hmotností do 500 g/mol.



S ohledem na tento parametr je nutné konstatovat, že v našem případě by měla snáze procházet kyselina chlorogenová, její molekulová hmotnost je 354,31 g/mol, rutin se svou molekulovou hmotností 610,52 g/mol nejspíše bude také procházet, ale hůře, v tomto ohledu totiž nehraje roli pouze velikost molekuly, ale také její prostorové uspořádání a navázané substituenty. Právě míra schopnosti látky interagovat s látkami v pokožce je dalším důležitým aspektem. Například nasubstituované ionty by procházely velmi špatně, nebo také schopnost látky vytvářet vodíkové můstky s látkami v kůži může významně ovlivnit její prostup, o čemž by se v případě fenolických látek dalo uvažovat.

### 3.11 Analýza HPLC

Na základě literární rešerše byla zvolena metoda chromatografické analýzy pro identifikaci a kvantitativní stanovení zvolených fenolických látek. Analýza vzorků probíhala na koloně Supelcosil LC-18-DB o rozměrech 250 x 4,6 mm, o velikosti částic sorbentu 5 µm. Jako mobilní fáze byla použita směs MeOH:voda:HCOOH v poměru 50:45:5 a separace probíhala izokratickou elucí. Průtok eluentu kolonou byl nastaven na 0,5 ml/min, teplota na koloně byla 30 °C a velikost dávkovací smyčky pro vzorek byla 10 µl. Pro analýzu byl použit detektor s diodovým polem, nastaven byl pouze na jednu vlnovou délku 360 nm. Každý vzorek byl před nadávkováním přefiltrován před 0,45 µm mikrofiltrem a třikrát proměřen. Následně byly z chromatogramů odečítány plochy a výšky píků v retenčních časech odpovídajících analyzovaným látkám. Pro zpracování dat byl použit software LC-10 a program MS excel.

### 3.12 Mez detekce (LOD), mez stanovitelnosti (LOQ) a kalibrační závislost

LOD a LOQ jsou hlavně závislé na chybě měření, tuto chybu může reprezentovat směrodatná odchylka nebo tzv. šum, což je časová fluktuace měřeného signálu v nepřítomnosti analytu. Oba tyto parametry závisí také na citlivosti metody, tedy na strmosti kalibrační závislosti. Za LOD se považuje takové množství (koncentrace) analytu, které způsobí změnu měřeného signálu v rozsahu trojnásobku velikosti šumu. U LOQ je to desetinásobek velikosti šumu. Obecně uznávaný výpočet pro kalibrační závislosti lineární povahy je:

$$LOD = \frac{3 \times h}{sm} \quad (1)$$

$$LOQ = \frac{10 \times h}{sm} \quad (2)$$

Kde:  $h$  je ustálená hodnota signálu šumu nebo chyba signálu získaného měřením blanku a  $sm$  je směrnice kalibrační závislosti.

Pro zpracování výsledků zde existuje více možností statistických metod, jednou z nich může být například, porovnání experimentálních hodnot ze série měření blanku s neznámým vzorkem.

Dále z hlediska mechanismu použití se rozlišují dva standardy, vnitřní a vnější. Vnější standardy jsou používány nezávisle na vlastním analyzovaném vzorku. Kalibrace pomocí vnějších standardů se děje před začátkem vlastního měření neznámého vzorku. Vnitřní kalibrace využívá definovaného přídatku standardu do analyzovaného vzorku s následným porovnáváním změřeného signálu se signálem původním. Přestože je analýza s vnitřními standardy rychlejší, výsledky bývají hůře reprodukovatelné [33].

Pro tuto práci byla zvolena kalibrace vnější se čtyřmi body kalibrační řady, tato kalibrační přímka sloužila ke kvantifikaci výsledků, tedy ke zjištění neznámé koncentrace látek po absorpci přes membránu a poté také k procentuálnímu vyjádření absorpce, použita byla také kalibrace vnější tzv. fortifikace, pro kvalitativní analýzu, tedy pro zvýraznění hledané látky v extraktu bezu černého, kde v příliš velkém množství píků nebylo jisté, které píky odpovídají hledaným látkám.

### **3.13 Příprava kalibrační řady**

Pro kvantifikaci absorbovaných látek, rutinu a kyseliny chlorogenové z extraktu bezu černého a zkušebních roztoků byly sestaveny kalibrační řady. Kalibrační roztoky pro rutin, rutin byl rozpuštěn v ethanolu a následně doplněn vodou. Jednotlivé roztoky kalibrační řady rutinu měly koncentraci 0,05; 0,005; 0,0005; 0,00005 g/l. Kalibrační roztoky kyseliny chlorogenové byly připraveny ve vodě a měly koncentraci 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 g/l. Roztoky byly analyzovány, byly odečítány plochy píků v retenčních časech charakteristických pro zkoumané látky, poté byla vynesena závislost koncentrace na ploše píků těchto kalibračních roztoků. Lineární rovnice regrese posloužily k ostatním kvantifikačním výpočtům.

## **4 VÝSLEDKY A DISKUZE**

### **4.1 Difuzní cely**

Experimenty s difuzními (Franzovými) celami byly hlavní náplní této práce. Po celou dobu práce jsme používali vertikální difuzní cely sestavené podle návodu popsaného v kapitole 2.9. Dodržovali jsme všechny zásady správného sestavení a používání této aparatury, jako bylo plnění akceptorové komory dlouhou jehlou, odebírání vzorků taktéž dlouhou jehlou a odebírání jen takového množství, aby nám neklesla hladina pod úroveň vnitřního dávkovacího otvoru, což by způsobilo vznik bublin a následně změnilo prostup zkoumaných látek. Mezi další důležité zásady patřilo namazání styčných ploch inertní vazelínou na zábrusy, abychom dosáhli co možná nejlepší přilnavosti membrán k oběma částem cely a zajistili tak definovanou styčnou plochu prostupu bez úniku vzorku mimo celu. Dále bylo nutné celu i dávkovací otvor uzavřít parafilmem a hliníkovou folií, aby nám látky co možná nejméně oxidovaly.

#### **4.1.1 Příprava kožní membrány**

Nedílnou součástí této práce byla příprava kožních membrán z prasečích uší. Výběr typu kožní membrány byl učiněn na základě studia literatury, výhody použití prasečího ucha jsou popsány v kapitole 1.3. Dále bylo na základě literární rešerše rozhodnuto, že uši budou zpracovávány a použity max. do dvou dnů po odběru, bez zmrazení nebo sušení. Čerstvost do dvou dnů by měla zajistit částečné zachování enzymatického systému kůže, takže v tomto případě při prostupu látek kůží nemusí jít jen o prostou difúzi. Dále bylo rozhodnuto používat kůži v plné tloušťce, vzhledem k náročnosti přípravy membrán ručně a vzhledem ke skutečnosti, že zkoumaný extrakt bezu černého by měl být dále využíván pro kosmetické topické přípravky.

Jak bylo výše zmíněno, zpracování kůže bylo realizováno ručně, pomocí chirurgického skalpele. Nejdříve bylo nutné ucho omýt běžnou vodou, poté destilovanou vodou a osušit, pak bylo potřeba najít nepoškozené a netetované místo. Toto místo bylo následně vyříznuto z prasečího ucha a seříznuto skalpelem, pokud možno tak, aby byla odstraněna celá tuková vrstva a nechána pouze epidermis a dermis. Bylo nutné, aby tloušťka membrány byla co nejhomogennější, jinak nám vzorek v podobě vodného nebo ethanolového roztoku protekl ven mimo celu a experiment nemohl být řádně realizován. Membrána také nemohla být ani moc tlustá a ani tenká, byla zde snaha o seříznutí membrán, pokud možno pokaždé v podobných tloušťkách, i když ručně toho bylo někdy velmi obtížné dosáhnout. Aby byla membrána co možná nejdokonaleji rovná byl vždy použit ruční mikrometr pro ověření tloušťky připravené membrány, bohužel nikdy se nepodařilo připravit dvě membrány o zcela stejné tloušťce, také

zde hrál roli fakt, že každé druhé ucho bylo samozřejmě z jiného prasete, a tak se vždy lišila tloušťka podkožního tuku a tím i jeho množství, které se nepodařilo odstranit a zůstalo na membránách použitých při pokusech. Ucho bylo seřezáváno ze všech stran boltce, jak z vnější, tak z vnitřní. Připravenou membránu jsme přitiskly na namazané plochy obou částí Franzovy cely a už jsme s ní nehýbali, po celou dobu experimentu.

Po skončení experimentu bylo možné sledovat, jak je membrána vysušená a tmavá na místech, která byla mimo celu, tam kde membránou procházel vzorek z jedné strany a z druhé přiléhal fyziologický roztok byla membrána dobře hydratovaná a světlá, jako čerstvá kůže.

Zároveň byly uskutečněny také experimenty se syntetickými membránami o velikosti 0,23  $\mu\text{m}$  a 0,40  $\mu\text{m}$ . Výsledky měření se syntetickými membránami byly porovnávány s výsledky měření na kožních membránách. Syntetické membrány byly umístěny na Franzovu celu stejným způsobem jako kožní membrány, styčné plochy byly také namazány inertní vazelínou, i když manipulace se syntetickou membránou byla o dost snazší vzhledem k jednotné tloušťce na celé ploše membrány, a tak nemusel být kladen takový důraz na pomazání inertní vazelínou, protože plochy velmi dobře přiléhaly k oběma částem difuzní cely.

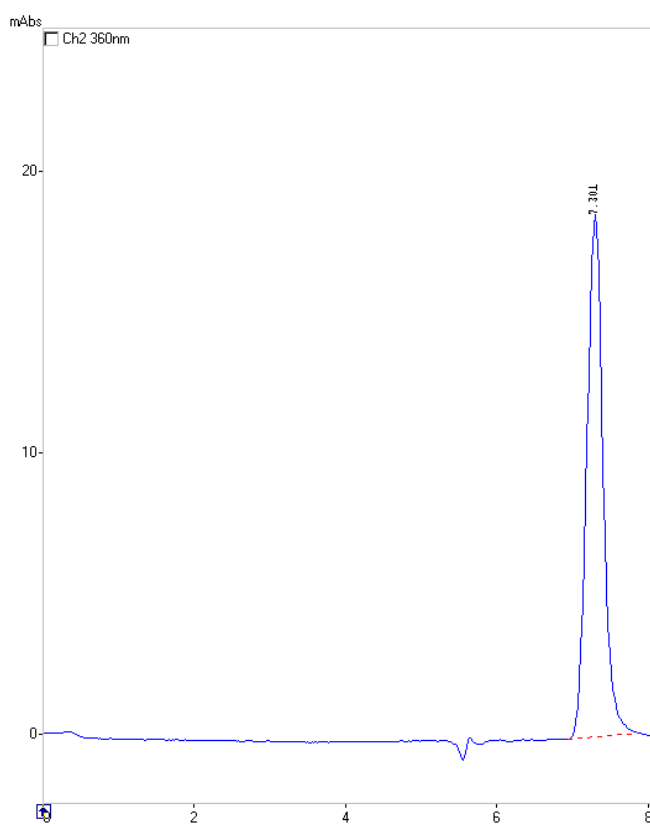
## **4.2 Metoda HPLC pro studium absorpce zkoumaných látek**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je běžně využívanou metodou ve farmacii, kosmetice a medicíně pro kvantifikaci obsahu účinných fenolických látek v různých rostlinných matricích, jak je výše uvedeno v kapitole 1.5. A na základě této rešerše byla tato metoda zvolena také pro naši práci.

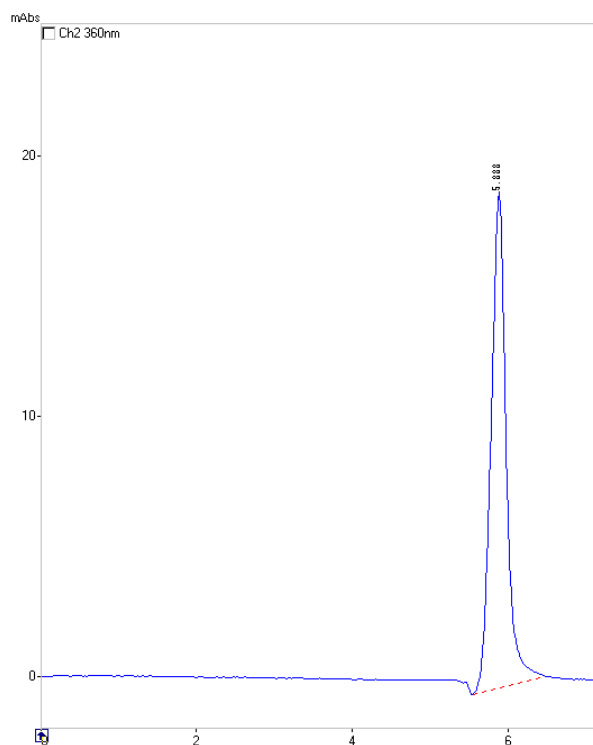
Pro separaci hledaných fenolických látek byla zvolena kolona Supelcosil LC-18-DB o rozměrech 250 x 4,6 mm, o velikosti částic sorbentu 5  $\mu\text{m}$ . Vzhledem k podobného charakteru zkoumaných látek a jejich chemické struktuře se dalo očekávat, že látky se budou separovat ne příliš daleko od sebe, navíc nepolární sorbent silikagelu zaručoval, že látky nebudou příliš zadržovány na stacionární fázi. Kyselina chlorogenová je velmi dobře rozpustná ve vodě je to tedy polární látka. Rutin se ve vodě příliš nerozpouští, nic méně je také polární, i když méně než kyselina chlorogenová, proto byl také na koloně déle zadržován. Takže byla nejdříve separována kyselina chlorogenová a poté rutin. Retenční čas pro rutin byl 7,3-7,9 a retenční čas pro kyselinu chlorogenovou byl 5,6-5,9. Drobné posuny retenčních časů mohly být způsobeny odpařováním methanolu a čerstvostí mobilní fáze. Složení mobilní fáze bylo

zvoleno na základě literatury a poté byly poměry jednotlivých složek mírně upraveny podle výsledků předešlých separací.

Nejdříve byly do HPLC vstříknuty standardní roztoky, abychom ověřili retenční časy separovaných látek. Chromatogramy standardů rutinu a kyseliny chlorogenové jsou přiloženy níže viz Obr.12 a Obr. 13. Poté byl nastříknut standardní roztok směsi rutinu a kyseliny chlorogenové, abychom si byli jisti dokonalou separací těchto dvou látek, a nakonec byl nastříknut samotný extrakt z bezu černého, který nebyl nijak upraven, pouze přefiltrován. Vzhledem k faktu, že samotný extrakt obsahoval velké množství různých fenolických látek, jež mají podobnou chemickou strukturu, bylo nutné ověřit dobrou separaci zkoumaných látek od ostatních látek, a také potvrdit opět retenční časy těchto látek. Také byly změřeny kalibrační řady pro rutin a kyselinu chlorogenovou. Všechny zkušební i standardní roztoky rutinu nebo směsi rutinu a kyseliny chlorogenové byly směsí vody s ethanolem. Protože je rutin ve vodě špatně rozpustný nebylo možné použít pouze vodu, nic méně s ohledem na záměr použít v budoucnu extrakty z bezu černého pro kosmetické účely byla vyloučena možnost rozpustit jej v čistém methanolu, proto jsme zvolili jako rozpouštědlo ethanol, v malém množství ethanolu jsme rutin rozpustili a poté doplnili vodou do požadovaného objemu.



Obr. 12: Chromatogram standardu rutinu



Obr. 13: Chromatogram standardu kyseliny chlorogenové

#### 4.2.1 Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ)

Pološířka píku rutinu byla učena na 0,3 minut, odezva signálu se sleduje po dobu odpovídající dvacetinásobku pološířky píku, proto byla tato odezva sledována 6 minut. Maximální kolísání základní linie slepého vzorku bylo (h) 0,05 mAbs. Tento výsledek byl převzat z práce [34], kde bylo měření provedeno na stejném přístroji za stejných podmínek.

Při stanovování meze detekce se výše uvedená hodnota kolísání základní linie (h) vynásobí 3 a poté vydělí směrnici (b), která je určena z kalibrační křivky závislosti výšky píku na koncentraci. Tuto závislost je možné ověřit v grafu Obr. 12.

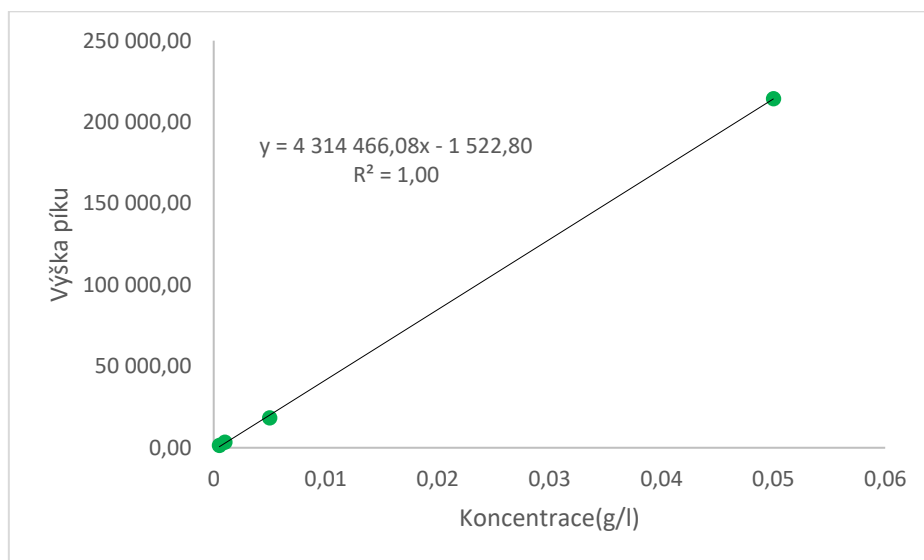
Mez stanovitelnosti se získá vynásobením výše uvedené hodnoty (h) deseti a poté vydělením směrnici (b) z kalibrační závislosti Obr. 14, je stejná jako u meze detekce.

Tímto způsobem byla mez detekce stanovena pro rutin na: 0,00003476608 mg/ml, a mez stanovitelnosti byla kvantifikována na: 0,000115889 mg/ml.

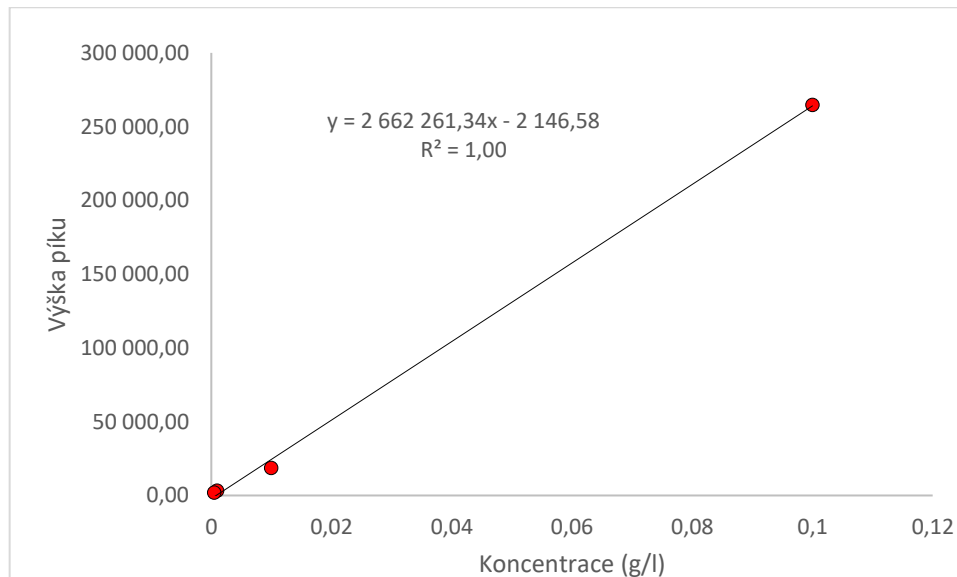
Mez detekce pro kyselinu chlorogenovou byla stanovena podobným způsobem jako u rutinu. Hodnota kolísání základní linie (h) byla 0,05 mAbs. Tato hodnota se vynásobí třemi a podělí směrnici (b) z kalibrační křivky pro kyselinu chlorogenovou viz Obr. 15.

Mez stanovitelnosti byla vypočítána také obdobným způsobem, hodnota h byla vynásobena deseti a poté podělena směrnici (b) z kalibrační křivky pro kyselinu chlorogenovou.

Mez detekce pro kyselinu chlorogenovou je: 0,0000347667 mg/ml, a mez stanovitelnosti byla stanovena na: 0,000115889 mg/ml.



Obr. 14: Kalibrační závislost pro výpočet meze detekce a stanovitelnosti pro rutin



Obr. 15: Kalibrační závislost pro výpočet meze detekce a stanovitelnosti kyseliny chlorogenové

#### 4.2.2 Kalibrační křivka rutinu

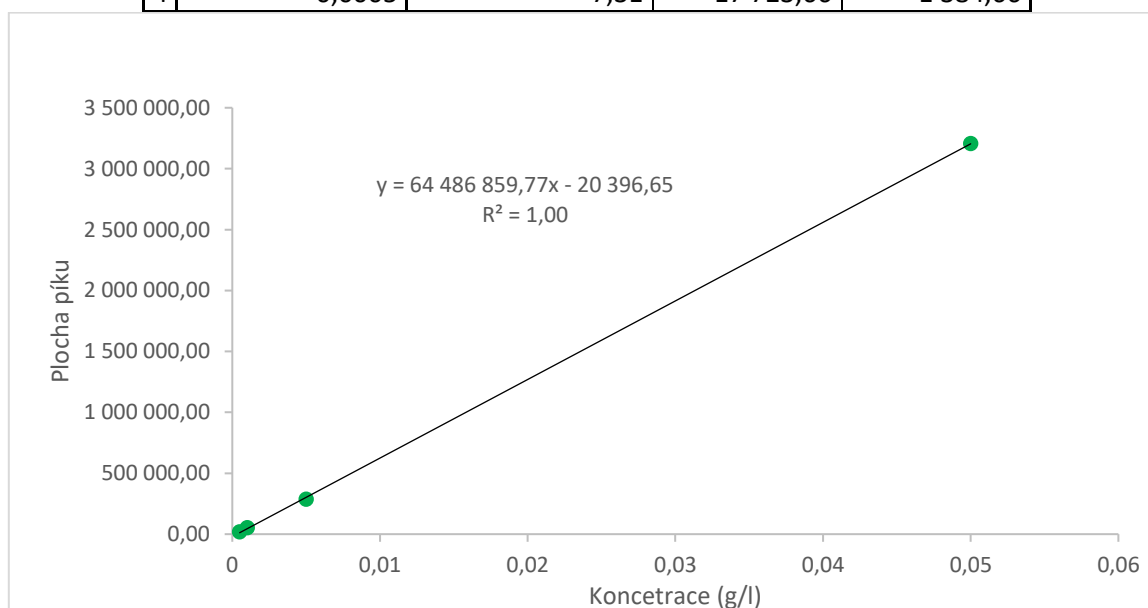
Jak již bylo zmíněno výše, kalibrační řada pro rutin obsahovala čtyři koncentrace a to 0,05; 0,005; 0,001; 0,0005 g/l. Roztoky byly připraveny ze základního roztoku o koncentraci 0,05 g/l, ze 100 ml toho základního roztoku bylo odebráno nejdříve 5 ml a doplněno vodou do

50ml odměrné baňky, tak jsme získali roztok o koncentraci 0,005 g/l. Roztok o koncentraci 0,001 g/l byl získán odebráním 1 ml ze základního roztoku a doplněn do 50ml odměrné baňky. Poslední roztok do kalibrační řady o koncentraci 0,0005 g/l byl připraven odebráním 0,5 ml ze základního roztoku a doplněním opět do 50ml odměrné baňky.

Každý takto připravený vzorek byl přefiltrován přes mikrofiltr a třikrát proměřen, poté byla na základě průměrných hodnot ploch píků sestrojena kalibrační křivka závislosti koncentrace na ploše píku viz. Obr.16 Průměrné retenční časy, plochy píků a výšky píků stanovovaných roztoků jsou uvedeny v tabulce Tab. 1.

Tab. 1: Kalibrační řada pro rutin

Kalibrační řada pro rutin				
	koncentrace (g/l)	retenční čas (min)	plocha píku	výška píku
1	0,05	7,27	3 205 194,66	214 339,50
2	0,005	7,30	287 480,33	18 440,66
3	0,001	7,29	51 522,33	3 511,33
4	0,0005	7,31	17 723,66	1 384,66



Obr. 16: Kalibrační křivka rutinu

#### 4.2.3 Kalibrační křivka kyseliny chlorogenové

Kalibrační řada pro kyselinu chlorogenovou obsahovala taktéž čtyři koncentrace: 0,1; 0,01; 0,001; 0,0005 g/l. Roztoky byly opět připraveny ze základního roztoku o koncentraci 0,1 g/l, ze 100 ml tohoto základního roztoku bylo odebráno 5 ml a doplněno vodou do 50ml odměrné baňky, tímto postupem jsme získali roztok o koncentraci 0,01 g/l. Abychom získali třetí roztok od koncentraci 0,001 g/l, bylo nutné ze základního roztoku odebrat 0,5 ml a opět doplnit vodou do 50ml odměrné baňky. Pro přípravu posledního roztoku o koncentraci

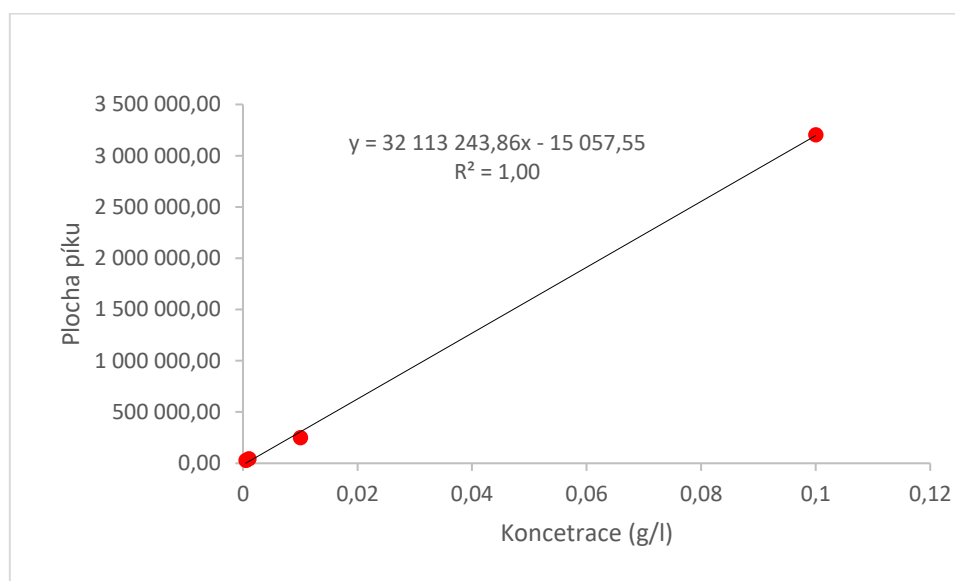


0,0005 g/l bylo odebráno ze základního roztoku 0,25 ml a doplněno jako obvykle vodou do 50ml odměrné baňky.

Každý takto připravený roztok byl stejně jako roztoky kalibrační řady pro rutin přefiltrován přes mikrofiltr a třikrát proměřen na HPLC, ze získaných ploch píků jsme sestavili kalibrační křivku závislosti koncentrace na ploše píku viz obr. 17 Průměrné retenční časy, plochy a výšky píků pro kalibrační roztoky kyseliny chlorogenové jsou uvedeny v tabulce Tab. 2.

Tab. 2: Kalibrační křivka kyseliny chlorogenové

Kalibrační řada pro kyselinu chlorogenovou				
	koncentrace (g/l)	retenční čas (min)	plocha píku	výška píku
1	0,1	5,86	3 201 579,00	264 628,33
2	0,01	5,89	249 041,33	18 590,33
3	0,001	5,88	43 572,66	3 137,66
4	0,0005	5,86	26 203,50	1 899,50



Obr. 17: Kalibrační křivka rutinu

#### 4.3 Závislost množství absorbované látky na čase působení

Metodou HPLC bylo studováno množství prošlých fenolických látek jak přes kožní membránu, tak přes syntetické membrány 0,23  $\mu\text{m}$ , 0,40  $\mu\text{m}$ . Jedním z cílů této práce bylo objasnit hledisko množství absorbovaných látek v závislosti na čase působení. Kvantifikace prošlých látek byla provedena pomocí rovnic regrese kalibračních křivek popsanych výše. A jak bylo uvedeno

v kapitolách 2.9 a 2.9.1 probíhaly všechny experimenty vždy dvakrát a vzorky byly odebírány ve třech časech, po 30 min, po 1 hod a po 24 hodinách.

Časy odběrů byly zvoleny na základě rešerše, kde byla doporučována maximální doba trvání experimentu 48 hodin, ale optimální doba trvání do 24 hodin. Po delším než 24 hodinovém působení vodného roztoku na kožní membránu dochází totiž k její nadměrné hydrataci a poté dojde k postupnému narušování její integrity. Odběry byly také naplánovány s ohledem na charakter zkoumaných látek, protože fenolické látky obecně na vzduchu rychle oxidují, zvolili jsme první odběr již po 30 minutách a druhý odběr po 1 hodině, abychom měli i srovnání týkající se možné míry oxidace. Také protože byly vzorky ve formě roztoků, buď vodných nebo ve směsi ethanol-voda, docházelo i po jejich přikrytí mikrofiltrem a hliníkovou folií k odpařování, také proto by náš experiment nemohl trvat 48 hodin.

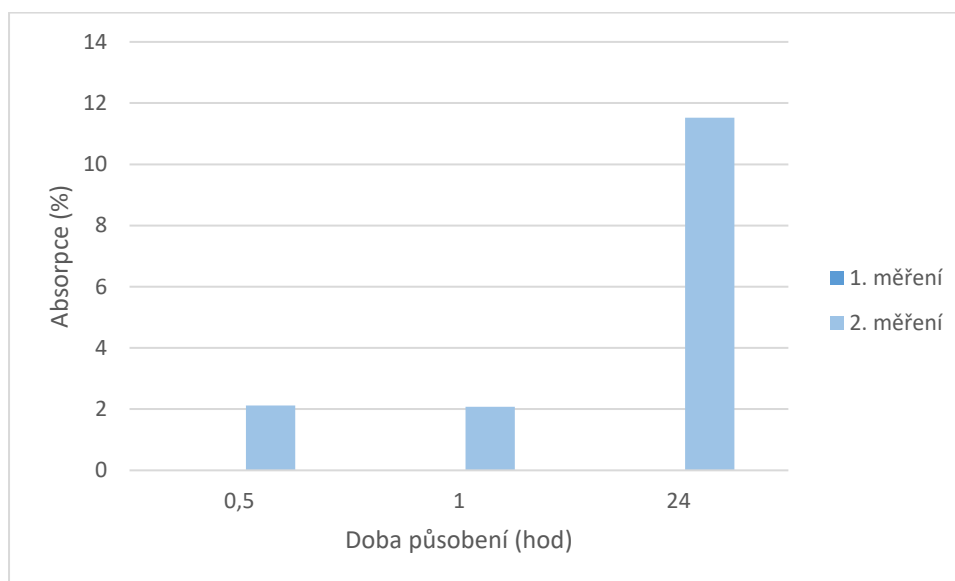
#### 4.3.1 Srovnání absorpce rutinu ve zkušebním roztoku s ohledem na čas působení

*Syntetická membrána 0,23  $\mu\text{m}$ :* Při srovnání prostupu rutinu přes tuto syntetickou membránu v druhém měření, v prvních dvou odběrových časech se hodnoty příliš neliší, jsou více méně stejné. Ale pokud srovnáme tyto první dva odběry s posledním odběrem tj., po 24 hodinách, vidíme zde celkem velký nárůst procenta absorpce prostoupené látky, což se nám zdá zcela logické, delší doba působení látky by měla zajišťovat větší množství prostoupené látky, zvláště pokud porovádíme měření na syntetické membráně s definovanou velikostí pórů, jejíž tloušťka je všude stejná. Navíc při pohledu na tento výsledek zde nejsou žádné známky přílišné oxidace vzorku.

Bohužel v prvním měření nebyl identifikován žádný pík odpovídající molekule rutinu, tento výsledek lze vysvětlit oxidací obsažené látky ve zkušebním roztoku, proto byl pro druhé měření namíchán čerstvý zkušební roztok a otvory utěsněny parafilmem a hliníkovou folií. Výsledky viz. Graf Obr.18 a tabulka Tab. 3.

Tab. 3: Rutin přes membránu 0,23  $\mu\text{m}$

	Odběr	Doba působení (hod)	Absorpce (%)
1.měření	1	0,5	0
	2	1	0
	3	24	0
2.měření	1	0,5	2,12
	2	1	2,08
	3	24	11,52

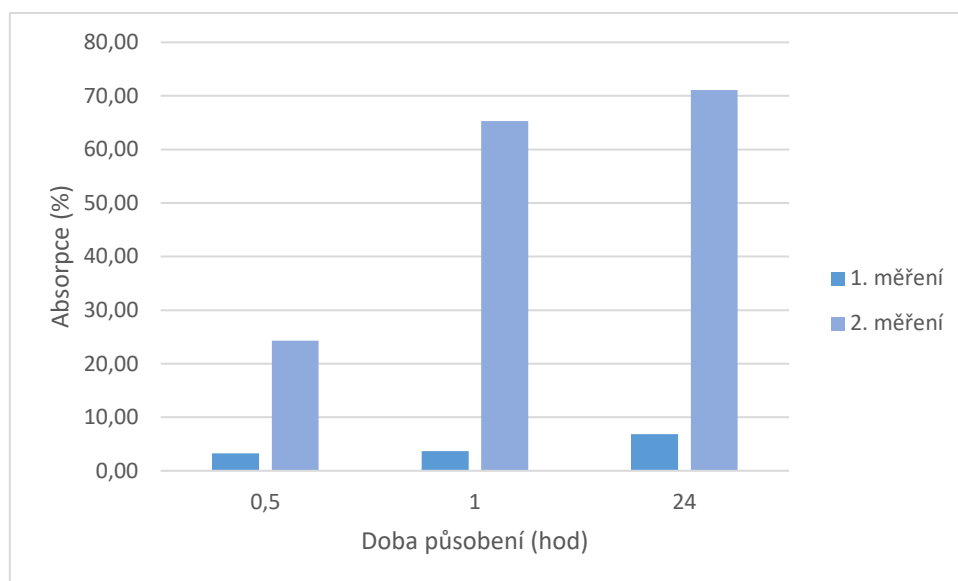


Obr. 18: Graf prostupnosti rutinu přes membránu 0,23 μm

*Syntetická membrána 0,40 μm:* Při srovnání prvního a druhého měření prostupu rutinu vidíme v podstatě vždy úměrně se zvyšující procento absorpce s časem, jak jsme předpokládali. I když v prvním měření prošlo rutin celkově méně přes syntetickou membránu, než v druhém měření, proto se domníváme, že rutin v připraveném zkušebním roztoku postupně zoxidoval. Z tohoto důvodu jsme již pro druhé měření a další experimenty připravovali zkušební roztoky vždy čerstvé. Opět si můžeme naměřené výsledky ověřit v níže přiloženém grafu Obr. 19 a tabulce Tab. 4.

Tab. 4: Rutin přes membránu 0,40 μm

	Odběr	Doba působení (hod)	Absorpce (%)
1.měření	1	0,5	3,28
	2	1	3,68
	3	24	6,84
2.měření	1	0,5	24,28
	2	1	65,32
	3	24	71,12



Obr. 19: Prostupnost rutinu přes membránu 0,40 µm

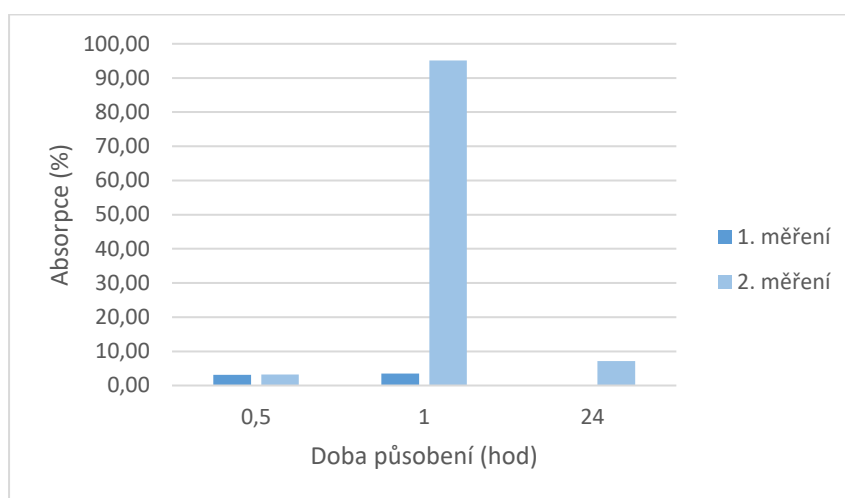
*Kožní membrána:* Při srovnání prvního a druhého měření absorpce rutinu přes biologickou membránou nejsou výsledky už tak jasné, jako výsledky vyplývající z měření na syntetických membránách.

Při prvních odběrech po 30 minutách, jsou výsledné procentuální absorpce téměř totožné. Nicméně při druhých odběrech po 1 hodině už nejsou výsledky příliš srovnatelné, zatím co v prvním měření se hodnota koncentrace velmi blíží hodnotě z prvního odběru, tudíž jako by se rutin již neabsorboval, v druhém měření je zde patrný opravdu velký nárůst procentuální absorpce, a to až ke sto procentům absorbovaného rutinu. Z toho rozdílu procentuální absorpce je patrné, že různost ručně připravených membrán zde hraje nemalou roli. Je zde také reálná možnost, že membrána z druhého měření mohla být mikroskopicky porušena, bohužel tak malá porušení není možné odhalit pouze vizuálním testem membrány. Tímto možným mikroskopickým porušením si vysvětlujeme již zmíněný vysoký nárůst absorpce.

Výsledky třetích odběrů po 24 hodinách nám přináší mírné překvapení, koncentrace rutinu v obou měřeních velmi klesla, v prvním měření dokonce nebyl ani identifikován pík odpovídající retenčnímu času rutinu, i když v druhém měření tento pík identifikován byl, hodnota absorpce byla velmi nízká, oproti předchozímu odběru. Tento výsledek se dá opět vysvětlit oxidací rutinu, je tedy zřejmé, že nebylo možné mikrofiltrem a hliníkovou folií otvory dostatečně utěsnit, přestože byly roztoky čerstvé. Popsané výsledky si můžeme ověřit v grafu Obr. 20 a tabulce Tab. 5.

Tab. 5: Rutin přes kůži

	Odběr	Doba působení (hod)	Absorpce (%)
1.měření	1	0,5	3,16
	2	1	3,52
	3	24	0
2.měření	1	0,5	3,20
	2	1	95,10
	3	24	7,12



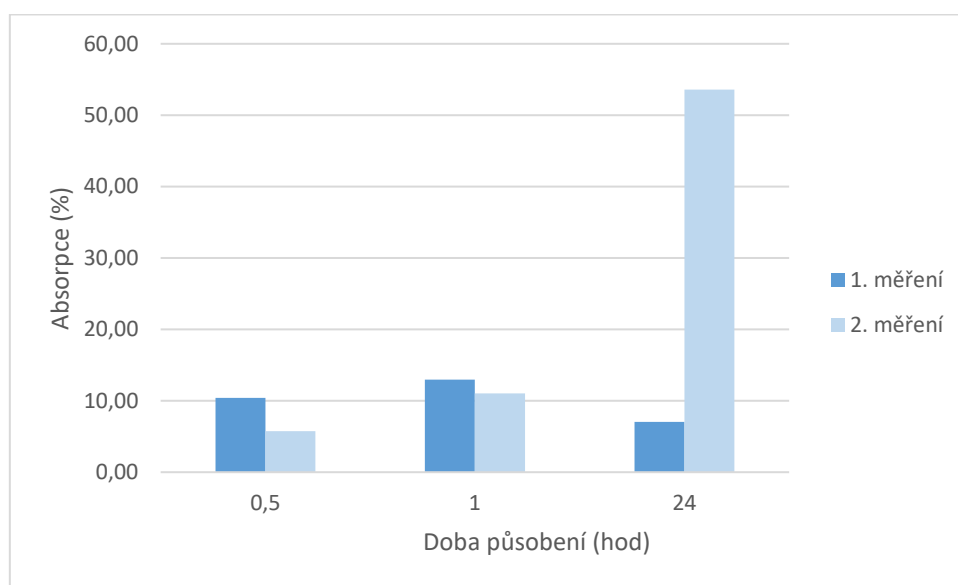
Obr. 20: Prostupnost rutinu přes kůži

#### 4.3.2 Srovnání absorpce k. chlorogenové ve zkušebním roztoku s ohledem na čas působení

*Syntetická membrána 0,23  $\mu\text{m}$ :* Při srovnání prvního a druhého měření u prvních dvou odběrů, tj. po 30 minutách a po 1 hodině, se absorpce zvyšuje s časem, i když samotné hodnoty se v jednotlivých měřeních liší. Tento výsledek je více méně očekáván. Při srovnání třetích odběrů po 24 hodinách u obou měření již zaznamenáváme různé výsledky, zatím co v druhém měření došlo opět k lineárnímu nárůstu absorpce v čase, a to až nad 50 procent absorpce. V prvním měření tomu tak není, a naopak dochází ke snížení procentuální absorpce téměř na polovinu hodnoty z prvního odběru po 30 minutách, tento výsledek si vysvětlujeme oxidací kyseliny chlorogenové, díky svým antioxidačním účinkům je na vzduchu velmi nestálá. Stejně tak i rutin, což jsme mohli vidět z výsledků uvedených v kapitole 4.3.1 konkrétně v měřeních přes biologickou membránu. Výsledky pro kyselinu chlorogenovou jsou doloženy grafem Obr. 21 a tabulkou Tab. 6.

Tab. 6: Kyselina chlorogenová přes membránu 0,23  $\mu\text{m}$

	Odběr	Doba působení (hod)	Absorpce (%)
1.měření	1	0,5	10,40
	2	1	12,96
	3	24	7,04
2.měření	1	0,5	5,76
	2	1	11,04
	3	24	53,60

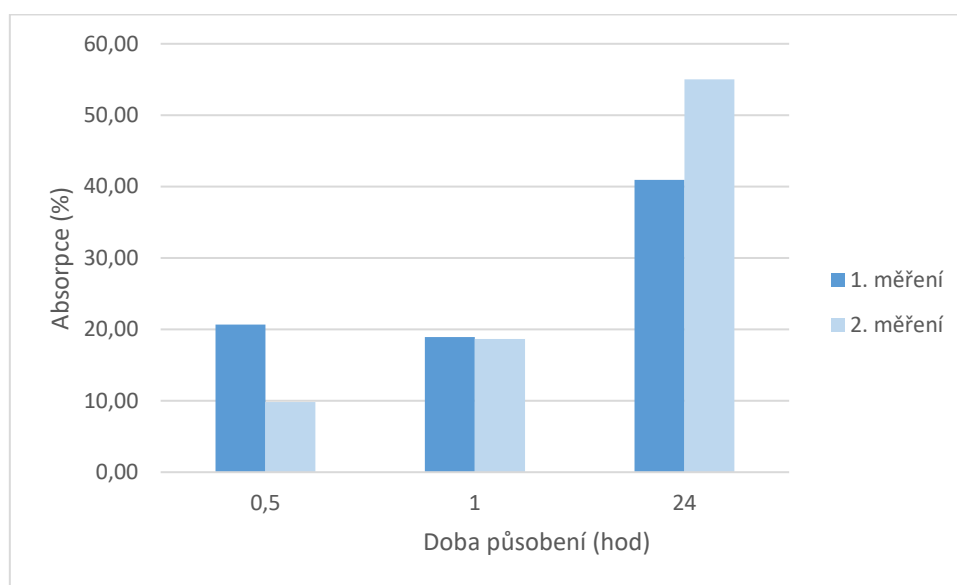


Obr. 21: Prostupnost kyseliny chlorogenové přes membránu 0,23  $\mu\text{m}$

*Syntetická membrána 0,40  $\mu\text{m}$ :* V obou měřeních došlo k nárůstu absorpce úměrně s časem, jediná odchylka od předpokladu byla v prvním měření při druhém odběru po 1 hodině, kdy došlo k mírnému poklesu procentuální absorpce kyseliny chlorogenové oproti prvnímu odběru po 30 minutách, je možné, že měřená látka po prostupu oxidovala, ale následně jak prostupovalo další množství kyseliny chlorogenové přes membránu bylo možné v posledním vzorku odebraného po 24 hodinách opět analyzovat nárůst absorpce srovnatelný s délkou působení roztoku. Výsledky jsou uvedeny v grafu Obr. 22 a tabulce Tab. 7 níže.

Tab. 7: Kyselina chlorogenová přes membránu 0,40  $\mu\text{m}$

	Odběr	Doba působení (hod)	Absorpce (%)
1.měření	1	0,5	20,68
	2	1	18,92
	3	24	40,92
2.měření	1	0,5	9,84
	2	1	18,64
	3	24	55,00

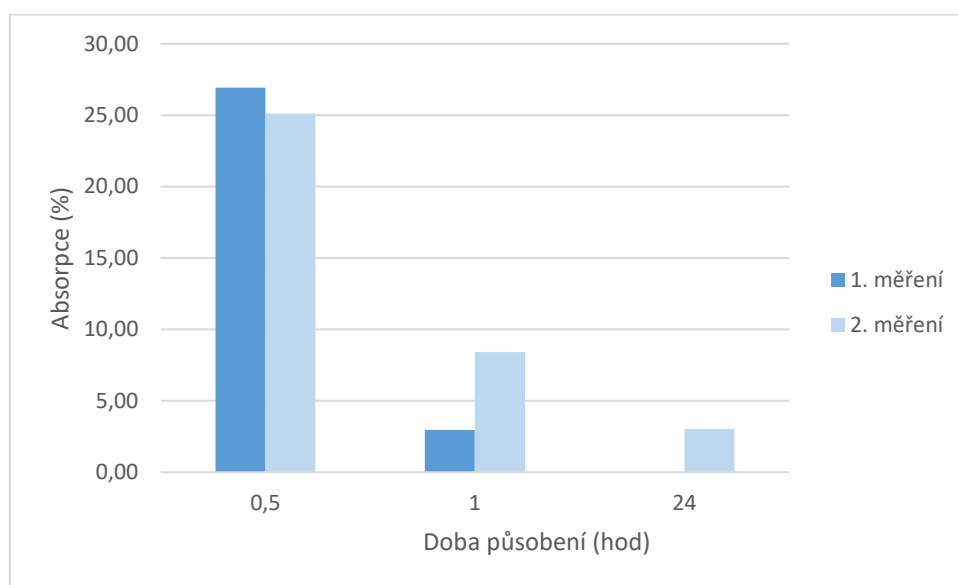


Obr. 22: Prostup kyseliny chlorogenové přes membránu 0,40  $\mu\text{m}$

*Kožní membrána:* Pokud bychom srovnali výsledky prostupu před biologickou membránou s ohledem na čas působení, je zde patrná zcela odlišná tendence oproti výše uvedeným výsledkům měření přes syntetické membrány. Zatím co v obou měřeních ve vzorcích odebraných po 30 minutách byla analyzována celkem vysoká hodnota procentuální absorpce kyseliny chlorogenové, v dalších odběrech po delších časových úsecích docházelo ke snižování této absorpce, až nakonec v prvním měření ve vzorku odebraném po 24 hodinách nebyl zaznamenán žádný pík v retenčním čase charakteristickém pro kyselinu chlorogenovou. A v druhém měření, ve vzorku odebraném rovněž po 24 hodinách bylo kvantifikováno velmi malé množství hledané látky. Z těchto výsledků by se dalo usuzovat, že biologická membrána více podporuje oxidaci kyseliny chlorogenové než syntetické membrány, lze ověřit v grafu Obr. 23 a tabulce Tab. 8. Tuto teorii si můžeme ověřit také v kapitole 4.3.1, kde nastal obdobný problém při prostupu rutinu přes kožní membránu.

Tab. 8: Kyselina chlorogenová přes kůži

	Odběr	Doba působení (hod)	Absorpce (%)
1.měření	1	0,5	26,92
	2	1	2,96
	3	24	0
2.měření	1	0,5	25,12
	2	1	8,40
	3	24	3,04



Obr. 23: Prostup kyseliny chlorogenové přes kůži

#### 4.3.3 Srovnání absorpce směsi kyseliny chlorogenové a rutinu s ohledem na čas působení

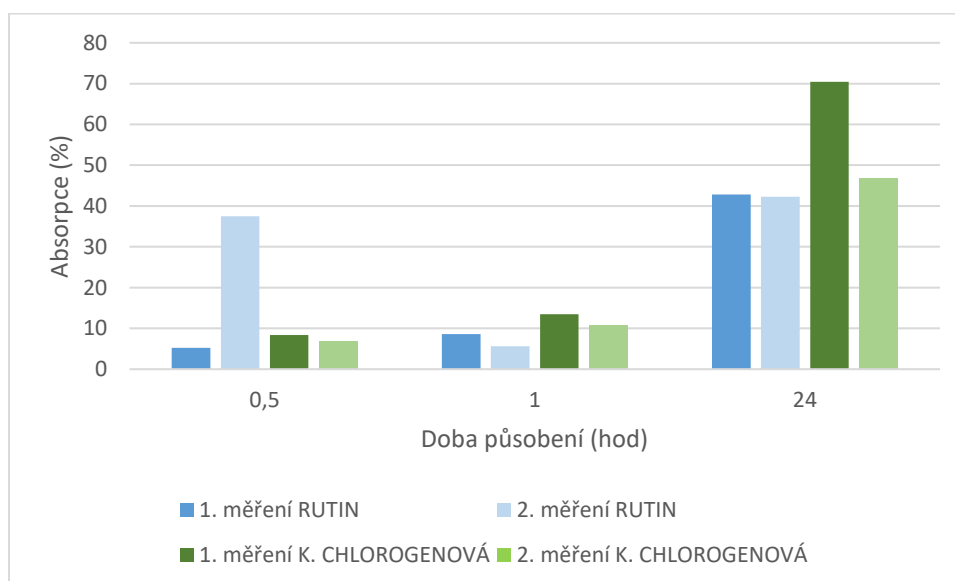
*Syntetická membrána 0,23  $\mu\text{m}$ :* Při srovnání obou látek uvolňujících se ze směsi zkušebního roztoku v obou měřeních, je jisté, že kyselina chlorogenová prochází membránou lépe, až na jednu výjimku v druhém měření, odběr po 30 minutách působení, zde je prošlé množství kyseliny chlorogenové nižší než množství prostoupeného rutinu. V těchto výsledcích se nejspíše odráží vyšší molekulová hmotnost a celkově větší velikost molekuly rutinu.

Pokud srovnáme tyto látky jednotlivě, pak je zjevné, že množství prostoupené kyseliny chlorogenové v závislosti na čase roste, u rutinu byla tato tendence stejná až na jednu odchylku při druhém měření, odběr po 1 hodině, zde došlo k poklesu absorpce oproti prvnímu odběru po 30 minutách, ale následně u třetího odběru po 24 hodinách je jasné, že došlo k opětovnému zvýšení absorpce látky, a tím i ke zvýšení procenta prostoupené látky na hodnotu vyšší než po prvním odběru. Podobná situace byla již popsána v kapitole 3.3.1 a odstavci věnujícímu se prostupu rutinu přes biologickou membránu. Výsledky viz graf Obr. 24 a tabulka Tab. 9.



Tab. 9: Směs rutinu a kyseliny chlorogenové přes membránu 0,23  $\mu\text{m}$

	Odběr	Doba působení (hod)	Absorpce (%)	
			RUTIN	K.CHLOROGENOVÁ
1.měření	1	0,5	5,25	8,364
	2	1	8,64	13,436
	3	24	42,8	70,424
2.měření	1	0,5	37,52	6,872
	2	1	5,6	10,84
	3	24	42,24	46,904



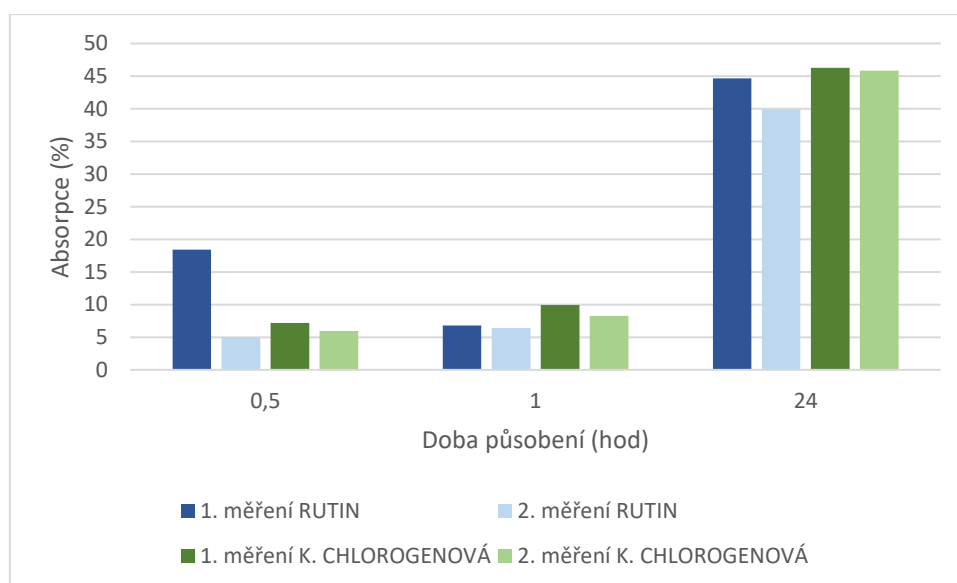
Obr. 24: Srovnání prostupnosti rutinu a kyseliny chlorogenové přes membránu 0,23  $\mu\text{m}$

*Syntetická membrána 0,40  $\mu\text{m}$ :* Uvolňování obou látek přes tento typ membrány měl podobnou tendenci jako u výše popsané syntetické membrány o velikosti pórů 0,23  $\mu\text{m}$ . Procentuální absorpce obou látek, kyseliny chlorogenové a rutinu se příliš neliší, až na výsledek z prvního měření v prvním odběru rutinu po 30 minutách, zde je absorpce rutinu více než dva krát vyšší oproti kyselině chlorogenové. Tendence zvyšujícího se procenta prostoupené látky s časem se zde také opakuje. Odchylka v podobě snížení absorpce je zde také, najdeme ji v prvním měření, odběr po 1 hodině, procento prostoupeného rutinu klesne a následně se zase zvýší na nejvyšší hodnotu, v odběru po 24 hodinách.

Celková míra absorpce rutinu má kolísavější charakter než absorpce kyseliny chlorogenové, kde jsou při obou měřeních ve stejných časech hodnoty absorpce téměř totožné. Výsledky jsou uvedeny v grafu Obr. 25 a tabulce Tab. 10.

Tab. 10: Směs rutinu a kyseliny chlorogenové přes membránu 0,40 µm

	Odběr	Doba působení (hod)	Absorpce (%)	
			RUTIN	K.CHLOROGENOVÁ
1.měření	1	0,5	18,4	7,204
	2	1	6,8	9,916
	3	24	44,64	46,256
2.měření	1	0,5	5,04	5,94
	2	1	6,4	8,284
	3	24	39,92	45,84



Obr. 25: Srovnání prostupnosti rutinu a kyseliny chlorogenové přes membránu 0,40 µm

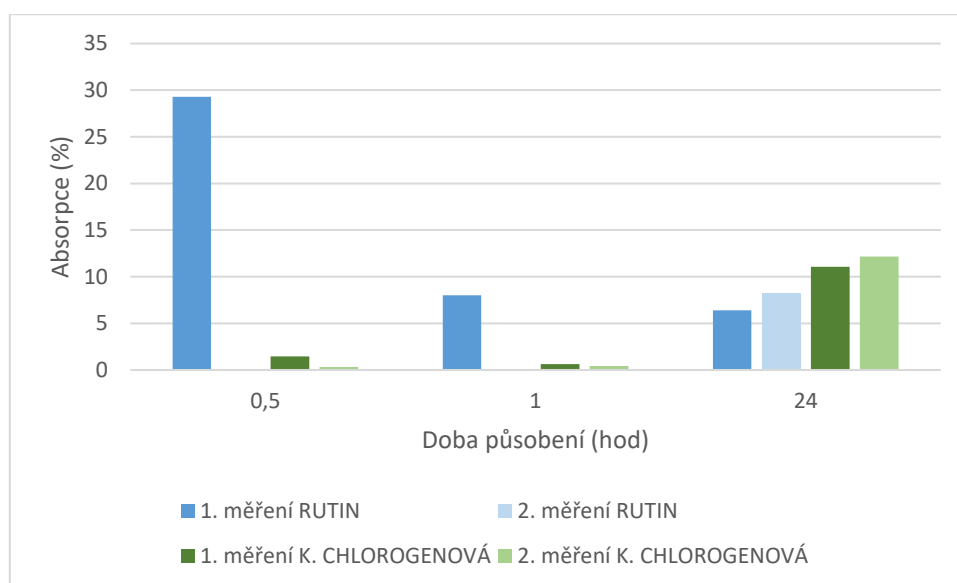
*Kožní membrána:* Charakter uvolňování kyseliny chlorogenové přes biologickou membránu je již kolísavější než ve výše popsanych případech, ale tendence růstu absorpce s časem je zde zachována. Pouze u prvního měření došlo k podobné odchylce, jaká byla sledována v předchozích případech u rutinu, totiž došlo zde ke snížení absorpce v odběru po 1 hodině a poté k jejímu následnému zvýšení na hodnotu vyšší než v předešlých dvou odběrech.

Prostup rutinu přes biologickou membránu má úplně opačný charakter než prostup kyseliny chlorogenové, dochází zde ke snižování procenta absorpce s časem, nejspíše dochází k jeho oxidaci, tuto závislost pozorujeme v prvním měření. Ve druhém měření nebyl v prvních dvou odběrech, tj. po 30 minutách a 1 hodině nalezen žádný pík odpovídající retenčnímu času pro rutin. Pouze v posledním odběru po 24 hodinách, byla identifikována odezva, hodnota absorpce se blíží hodnotě absorpce kyseliny chlorogenové ve stejném čase. S ohledem

na chemický charakter této látky zde mohlo dojít k zadržení rutinu v epidermis, rutin je mírně hydrofobní. Výše popsané výsledky viz graf Obr. 26 a tabulka Tab. 11.

Tab. 11: Směs rutinu a kyseliny chlorogenové přes kůži

	Odběr	Doba působení (hod)	Absorpce (%)	
			RUTIN	K.CHLOROGENOVÁ
1.měření	1	0,5	29,28	1,448
	2	1	8	0,632
	3	24	6,4	11,06
2.měření	1	0,5	0	0,316
	2	1	0	0,412
	3	24	8,24	12,156



Obr. 26: Srovnání prostupnosti rutinu a kyseliny chlorogenové přes kůži

#### 4.3.4 Srovnání absorpce extraktu bezu černého s ohledem na čas působení.

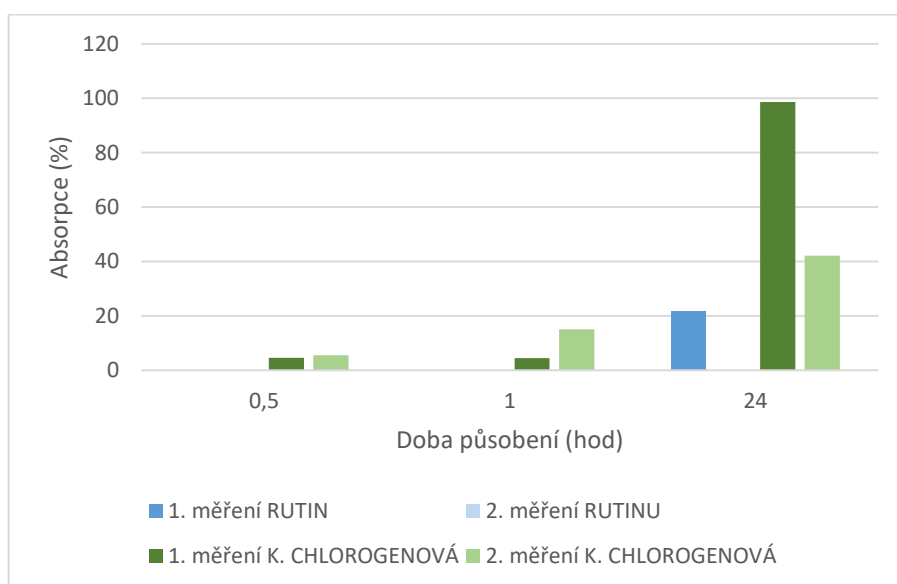
*Syntetická membrány 0,23  $\mu\text{m}$ :* Zatím co v případě kyseliny chlorogenové můžeme pozorovat zvyšování procentuální absorpce prostoupené látky lineárně s časem, v obou měřeních, i když mají hodnoty ve stejných časech odběru širší rozpětí, tendence růstu koncentrace je zachována. U prvního měření v odběru po 24 hodinách dokonce prošlo přes membránu veškeré množství kyseliny chlorogenové.

U rutinu nic podobného nezaznamenáváme, v prvním měření byla nalezena odezva pouze ve třetím odběru po 24 hodinách, v předchozích dvou odběrech nebyl nalezen žádný odpovídající pík. Je tedy možné, že póry membrány byly zahlceny kyselinou chlorogenovou,

kteřá má celkově menší molekulu, tudíž by měla membránou lépe procházet, proto v prvních dvou odběrech nebyl identifikován žádný rutin. V druhém měření nebyl ani v jednom vzorku nalezen pík v odpovídajícím retenčním čase. Tyto výsledky lze ověřit v příložené tabulce Tab. 12 a grafu Obr. 27.

Tab. 12: Extrakt bezu černého přes membránu 0,23  $\mu\text{m}$

			Absorpce (%)	
	Odběr	Doba působení (hod)	RUTIN	K.CHLOROGENOVÁ
1.měření	1	0,5	0	4,624
	2	1	0	4,502
	3	24	21,822	98,62
2.měření	1	0,5	0	5,547
	2	1	0	15,004
	3	24	0	42,105



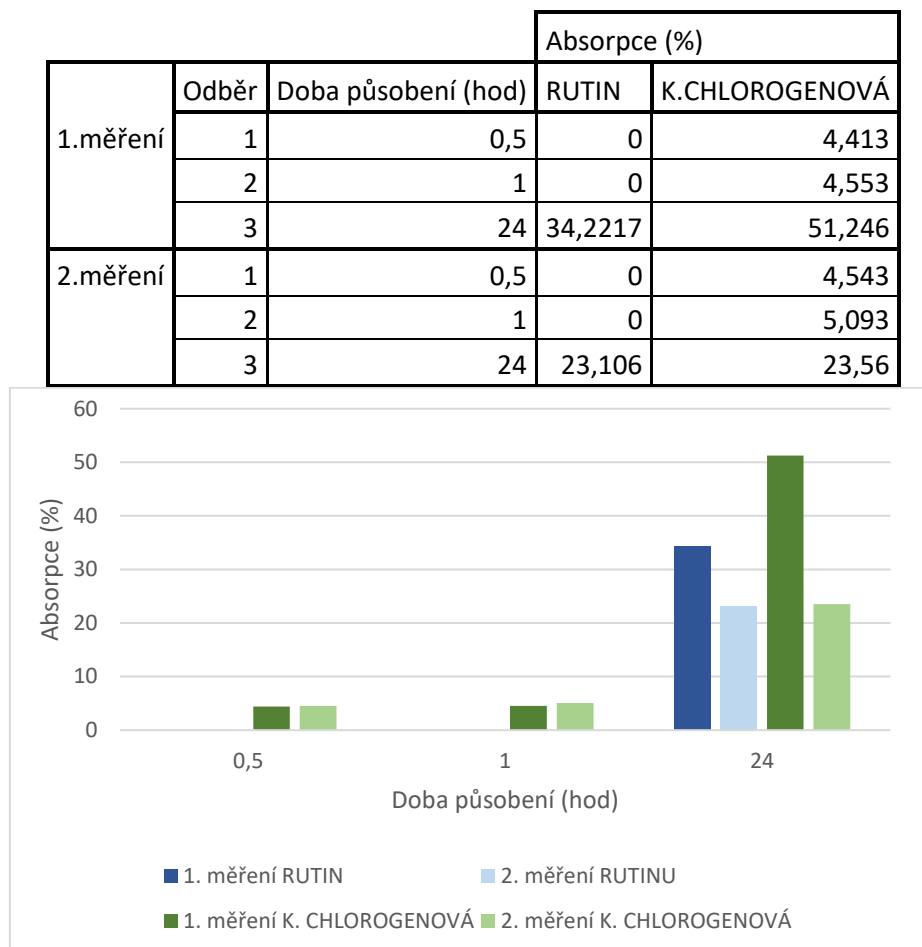
Obr. 27: Srovnání prostupnosti rutinu a kys. chlorogenové z extraktu přes membránu 0,23  $\mu\text{m}$

*Syntetická membrána 0,40  $\mu\text{m}$ :* Míra absorpce kyseliny chlorogenové zde má stejnou tendenci růstu s časem jako ve výše uvedeném případě syntetické membrány 0,23  $\mu\text{m}$ , opět v obou měřeních. Nenalézáme ani žádné známky oxidace látky.

U rutinu dochází ke zcela jinému jevu, v prvních dvou odběrech, tj. po 30 min. a po 1 hodině, v obou měřeních, nebyl registrován žádný odpovídající signál. Ve třetích odběrech po 24 hodinách, také v obou měřeních, již byl zaznamenán pík odpovídající rutinu. Procentuální absorpce se velmi blíží hodnotám absorpce kyseliny chlorogenové po

24 hodinách, z výsledků tedy vyplývá, že rutin začne prostupovat membránou až po kyselině chlorogenové. Popsané výsledky viz tabulka Tab. 13 a graf Obr. 28.

Tab. 13: Extrakt bezu černého přes membránu 0,40  $\mu\text{m}$



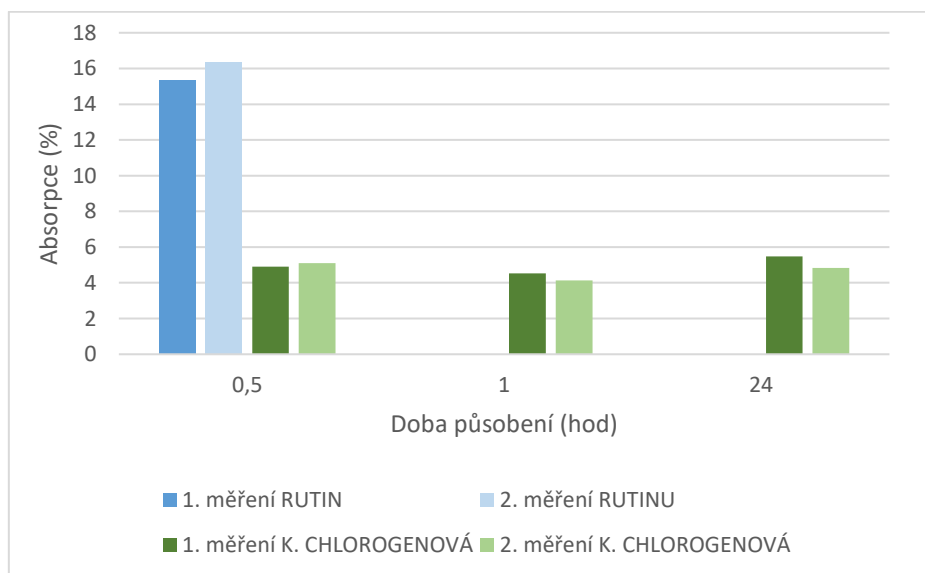
Obr. 28: Srovnání prostupnosti rutinu a kys. chlorogenové z extraktu přes membránu 0,40  $\mu\text{m}$

*Kožní membrána:* Uvolňování kyseliny chlorogenové přes biologickou membránu nemá již tak jasně stoupající charakter jako u syntetických membrán. V prvním měření ve všech odběrech se míra absorpce drží více méně na stejných hodnotách, již nezaznamenáváme tak strmý nárůst absorpce v posledním odběru po 24 hodinách jako v případě syntetických membrán. Naproti tomu v druhém měření dochází k úplně opačné tendenci, a to ke snižování procenta absorpce v čase, opět není klesání nijak markantní. I když v posledním odběru po 24 hodinách je míra absorpce mírně vyšší než v předchozím odběru po 1 hodině, přesto je celková tendence absorpce spíše klesající. Z těchto výsledků je jasné, že mechanismus prostupu kyseliny chlorogenové přes kůži podléhá komplikovanějším procesům, než difuze přes membrány syntetické.

I v případě rutinu má absorpce přes biologickou membránu zcela jiný charakter, zatím co u syntetických membrán byl signál zaznamenán až při posledních odběrech, tj. po nejdelší době působení látky, tak zde u biologické membrány byl zaznamenán odpovídající pík rutinu pouze po prvním odběru, tj. po 30 minutách působení, v obou měřeních. Hodnoty absorpce vysoce převažují procentuální hodnoty absorpce kyseliny chlorogenové. V dalších dvou odběrech, tj. po 1 hodině a po 24 hodinách nebyl již nalezen žádný signál odpovídající rutinu, opět docházíme k závěru, že biologická membrána zřejmě podporuje oxidaci rutinu, jak jsme již mohli vidět v přechozích kapitolách 4.3.1 a 4.3.3 v měřeních přes kožní membránu. Popsané výsledky viz tabulka Tab. 14 a graf Obr. 29.

Tab. 14: extrakt bezu černého přes kůži

			Absorpce (%)	
	Odběr	Doba působení (hod)	RUTIN	K.CHLOROGENOVÁ
1.měření	1	0,5	15,359	4,904
	2	1	0	4,522
	3	24	0	5,477
2.měření	1	0,5	16,339	5,095
	2	1	0	4,14
	3	24	0	4,84



Obr. 29: srovnání prostupnosti rutinu a kyseliny chlorogenové z extraktu přes kůži

#### **4.4 Srovnání míry transdermálního prostupu modelového systému s reálným systémem**

Tato část práce se bude zabývat, pokud možno co nejpodrobnějším porovnáním vyhodnocených dat v závislosti na typu použitých membrán, ve smyslu srovnání modelového systému, který představují všechny použité zkušební roztoky a reálného systému, který je reprezentován samotným extraktem z bezu černého.

Jak již bylo výše zmíněno experiment probíhal na třech typech membrán, z toho dvě byly syntetické (velikost pórů 0,23  $\mu\text{m}$  a 0,40 $\mu\text{m}$ ) a jedna biologická, získána z prasečího ušního boltce. Tyto dva typy syntetických membrány byly vybrány z důvodu lepší porovnatelnosti výsledků, a také proto abychom zjistili, jestli jsou vybrané fenolické látky vůbec schopny nějaké absorpce, přes takto definované velikosti pórů. S přihlédnutím na chemickou strukturu, velikost, chemické a fyzikální vlastnosti fenolických látek, nám tyto membrány sloužily také jako ověřovací a srovnávací materiál, dále nám dopomohly pochopit proces absorpce těchto látek, možnou míru jejich oxidace nebo tendenci se navzájem ovlivňovat. I když bylo klíčovým bodem této práce realizovat experimenty absorpce vybraných fenolických látek přes biologickou kožní membránu, za účelem zjištění potenciálu pro budoucí možné využití těchto látek v kosmetice, nedílnou a nutnou součástí bylo také použití výše popsanych syntetických membrán. Obě tyto membrány byly nitrocelulózové, lišily se pouze ve velikosti pórů.

##### **4.4.1 Diskuze výsledků absorpce rutinu v modelovém a reálném systému**

Z níže uvedené tabulky Tab. 15, obsahující výsledky procentuální absorpce rutinu zprůměrované z obou provedených opakovacích měření všech roztoků jasně vyplývá, že rutin lépe absorbuje z připravených zkušebních roztoků, a to jak v případě syntetických, tak v případě biologické membrány. Tento výsledek si vysvětlujeme složením zkušebních roztoků, které obsahovaly buď jen rutin, vodu a minimální množství ethanolu nebo rutin, vodu a kyselinu chlorogenovou. Zatím co samotný extrakt, nejen že obsahoval větší množství ethanolu, které mohlo velmi ovlivnit absorpci, ale obsahoval také i další různé fenolické látky, je tedy pravděpodobné, že došlo k vzájemnému ovlivňování těchto látek. Dále i když byl roztok přefiltrován, mohl obsahovat mikroskopické nečistoty, které zanesly póry. Také jak bylo uvedeno v kapitole 3.10 v případě biologické membrány mohlo docházet k zachytávání rutinu ve stratum corneum z důvodu jeho vyšší lipofility, a také z důvodu nízké hodnoty rozdělovacího koeficientu, která není zcela v normě, co se týká teoretických předpokladů dobrého prostupu. Dále pak mohlo docházet k vytváření vodíkových můstků s látkami v kůži

nejen v případě rutinu, ale také ostatních obsažených látek. Kůže také obsahuje ionty kovů, tedy nabitě částice, které určitě ovlivňují prostup látek kůží.

Pokud bychom se blíže podívali na absorpci reálného systému tedy extraktu přes kůži, z výsledků je patrné že rutin spíše neprochází. Záznam o prostupu látky máme pouze po nejkratší době působení, je tedy jasné, že rutin je velmi nestálý, a tak pokud projde membránou, rychle podléhá zkáze ve fyziologickém roztoku. Proto by bylo vhodné pro příští měření navrhnout systém s efektivnějším zabráněním oxidace.

Nejvíce procent absorbovaného rutinu z čistého extraktu bylo zaznamenáno v měření přes membránu 0,40  $\mu\text{m}$ . Tento výsledek byl předvídan, protože velikost pórů 0,40  $\mu\text{m}$  je dost velká na to, aby prošly i velmi velké molekuly, dále díky homogenní tloušťce a jednotné velikosti všech pórů docházelo k pozvolnému prostupu látky, i kdyby se látky v extraktu z bezu černého vzájemně ovlivňovaly, velikost pórů byla dostatečná, takže nedocházelo k jejich přílišnému zachytávání na membráně.

Tab. 15: Shrnutí výsledků absorpce rutinu ze všech měření

Typ vzorku	Doba působení (hod)	Absorpce (%)		
		membrána 0,23 $\mu\text{m}$	membrána 0,40 $\mu\text{m}$	Kůže
zkušební roztok rutinu	0,5	1,06	13,78	3,18
směsný roztok	0,5	21,385	11,72	14,64
extrakt bezu černého	0,5	0	0	15,849
zkušební roztok rutinu	1	1,04	34,5	49,31
směsný roztok	1	7,12	6,6	4
extrakt bezu černého	1	0	0	0
zkušební roztok rutinu	24	5,76	52,03	3,56
směsný roztok	24	42,52	42,28	7,32
extrakt bezu černého	24	10,911	28,663	0

#### 4.4.2 Diskuze výsledků absorpce kyseliny chlorogenové v modelovém a reálném systému

Z tabulky Tab. 16, kde jsou uvedeny zprůměrované procentuální absorpce ze všech měření vztažené na použité typy membrán vyplývá, že kyselina chlorogenová prochází alespoň v malé míře všemi typy membrán ze všech typů roztoků. Vůbec nevyšší procento prostupu jsme zaznamenali v případě měření čistého extraktu přes membránu o velikosti pórů 0,23  $\mu\text{m}$ . Tento výsledek je mírně překvapující, i když kyselina chlorogenová má menší velikost molekuly, takže mohla procházet snáze, ale jako bychom zde nezaznamenali žádné přídatné interakce s ostatními látkami obsaženými v extraktu.



V porovnání modelového a reálného systému vidíme největší hodnoty absorpce v případě membrány o velikosti pórů 0,40  $\mu\text{m}$ , stejně jako v kapitole 4.4.1. I v tomto případě je výsledek nejspíše zapříčiněn právě velikostí pórů, která je dost velká na to, aby příliš nezadržovala molekuly kyseliny chlorogenové.

Co se týče samotného prostupu kůží nejlépe opět vyšly zkušební roztoky kyseliny chlorogenové a směsi kyseliny chlorogenové s rutinem, opět dohazíme ke stejnému závěru, tedy složení zkušebních roztoků je klíčové. Samotný průstup kyseliny chlorogenové přes kůži hodnotíme kladně, jeho procentuální hodnota absorpce se pohybuje kolem 5 %. V žádném z případů se nestalo, že by nebyl identifikován pík kyseliny chlorogenové.

Tab. 16: Shrnutí absorpce kyseliny chlorogenové (KCH) ze všech měření

Typ vzorku	Doba působení (hod)	Absorpce (%)		
		membrána 0,23 $\mu\text{m}$	membrána 0,40 $\mu\text{m}$	kůže
zkušební roztok KCH	0,5	8,08	15,26	26,02
směsný roztok	0,5	7,618	6,572	0,882
extrakt bezu černého	0,5	5,0855	4,478	4,9995
zkušební roztok KCH	1	12	18,78	5,68
směsný roztok	1	12,138	9,1	0,522
extrakt bezu černého	1	9,753	4,823	4,331
zkušební roztok KCH	24	30,32	47,96	1,52
směsný roztok	24	6,4	46,048	23,216
extrakt bezu černého	24	70,3625	37,403	5,1585

#### 4.4.3 Srovnání prostupu rutinu a kyseliny chlorogenové

Výsledky ze všech měření v podstatě podporují teorie z kapitoly 3.10 a to totiž, že kyselina chlorogenová je lepším kandidátem na průstup přes biologickou membránu. Není sice kandidátem ideálním, ale provedená měření potvrdila, že prochází všemi typy membrán. I když z některých výsledků jsou jasně patrné známky oxidace, nebyl tento problém zaznamenán tak často jako u rutinu. V případě rutinu jeho míra oxidace hraje často velkou roli ve výsledcích. Z výsledků je dále zřejmé, že z extraktu prostupuje lépe kyselina chlorogenová přes všechny typy membrán, rutin je více zadržován, což může být způsobeno jejich rozdílnou molekulovou velikostí. To že prostupuje z extraktu bezu černého ve většině případech více kyseliny chlorogenové je také dáno množstvím této látky v něm obsaženém. V 1 l extraktu je totiž obsaženo 62,957 mg kyseliny chlorogenové a pouze 12,24 mg rutinu, což se samozřejmě odráží ve výsledcích měření.

Při zaměření se na biologickou membránu také jasně vyplývá, že kyselina chlorogenová je stálejší v prostupu a nepodléhá tolik oxidaci a interakcím s látkami v kůži. Z teoretických předpokladů prostupnosti ve výše uvedené kapitole hrozilo, že díky své hydrofilitě by mohla mít kyselina chlorogenová problém se vstupem do svrchní části pokožky, stratum corneum je spíše hydrofilní, tyto obavy se ale příliš nepotvrdily, ve všech případech nakonec kyselina chlorogenová prostoupila přes membránu. Zatím co rutin v některých případech neprostoupil kůží vůbec. I když byly právě u rutinu v krátkých časech působení zaznamenány vysoké hodnoty absorpce, časem došlo, k již mnohokrát diskutované oxidaci. Pro další experimenty by bylo velmi vhodné použít i tzv. stripování kůže, abychom potvrdili domněnky o zadržování kyseliny chlorogenové na povrchu kůže nebo rutinu v epidermis.

## 5 ZÁVĚR

Hlavním tématem této diplomové práce byl transdermální přechod vybraných fenolických látek. Teoretická část se zaměřovala především na rozdělení a účinky fenolických látek na lidské tělo. Také se detailněji věnovala anatomii kůže a problematice procesu stárnutí kůže a případnému zvrácení těchto změn, právě pomocí fenolických látek. Nedílnou součástí byla také rešerše současného stavu výzkumu fenolických látek v oblasti kosmetiky a medicíny, a také způsoby kvantifikace fenolických látek v různých rostlinných matricích pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Experimentální část se věnovala zejména pozorování transdermálního prostupu vybraných fenolických látek, kterými byly rutin a kyselina chlorogenová. Tyto látky jsou obsaženy v bezu černém, jako levném a lehce dostupném zdroji, proto je stěžejním bodem experimentální části sledování prostupu samotného extraktu z bezu černého přes kůži. Odebrané vzorky byly následně analyzovány na HPLC.

Pro testování in vitro byla vybrána prasečí kůže z ušního boltce, zpracována byla ručně chirurgickým skalpelem. Prostup rutinu a kyseliny chlorogenové byl realizován pomocí Franzových cel. Prostup těchto látek byl sledován nejen u čistého extraktu z bezu černého, ale také u zkušebních roztoků rutinu, kyseliny chlorogenové a také směsi těchto dvou látek. Tyto zkušební roztoky sloužily zejména pro porovnání výsledků s extraktem a jako zkouška, jestli jsou tyto látky vůbec schopny absorpce přes membrány. Jako membrány byly použity výše zmíněné prasečí uši a syntetické membrány dvojího typu, které také sloužily jako srovnávací modelový systém.

Experimenty potvrdily, že obě vybrané látky procházejí membránami jak syntetickými, tak biologickým, i když v některých případech ne zcela ochotně, přesto byl průstup zaznamenán. Všeobecně lépe prostupovala kyselina chlorogenová, u které nebyly ani přílišné známky oxidace, průstupnost kůží se pohybovala kolem 5 %. Zatím co rutin prostupoval hůře přes membránu s nejmenšími póry tj. 0,23  $\mu\text{m}$ , a i přes kůži, procentuální absorpce přes kůži se pohybovala od 0 % až 70 %. Také zde byly často známky oxidace, v některých případech dokonce jeho úplné oxidace ze zkušebního roztoku. V tomto případě by bylo namístě se v příštích měřeních zaměřit na zamezení nebo alespoň omezení jeho oxidace. Další z překážek u rutinu byla jeho malá rozpustnost ve vodě, proto bylo nutné jej rozpustit v malém množství ethanolu, který ale pak mohl hrát důležitou úlohu v míře absorpce rutinu, pokud se zcela

neodpařil. Všechny výsledné procentuální absorpce včetně ovlivňujících aspektů u obou těchto látek byly v této práci podrobně diskutovány.

Celá experimentální část je pilotní studií na toto téma, hlavní motivací pro studium transdermální absorpce fenolických látek bylo jejich možné budoucí využití v kosmetice nebo lázeňství, jako dobrý zdroj antioxidantů. Toto téma by se dalo dále rozvíjet, je potřeba hlavně optimalizovat metodu transdermálního přechodu z hlediska stálosti fenolických látek, které velmi rychle oxidují. Dále by bylo vhodné při analýze provádět i tzv. stripování kůže, aby bylo zcela jasné, co přesně se s látkou děje od nadávkování vzorku do donorové části až po jeho odebrání z přijímací komory. Také by bylo vhodné vylepšit přípravu kožních membrán, došli jsme k závěru, že ruční příprava membrán není příliš vhodná metoda pro měření vodných roztoků, nejlepší způsob přípravy kožních membrán by byl pomocí mikrotomu, čímž bychom dosáhli homogenní tloušťky membrány na celém jejím povrchu, což je v případě vodných roztoků opravdu stěžejní. Fenolické látky jsou velmi široká skupina látek a v extraktech z bezu černého je jich samozřejmě obsaženo o mnoho více než jen rutin a kyselina chlorogenová, proto by se tato práce mohla dále rozšířit o další fenolické látky.

## 6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] HAVLÍK, Jaroslav a Milan MAROUNEK. Živiny a živinové potřeby člověka: učebnice pro studenty ČZU v Praze. 2. vyd. V Praze: Česká zemědělská univerzita, 2013. ISBN 978-80-213-2374-2.
- [2] BOROS, Borbála, Silvia JAKABOVÁ, Ágnes DÖRNYEI, Györgyi HORVÁTH, Zsuzsanna PLUHÁR, Ferenc KILÁR a Attila FELINGER. Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in Thymus species. *Journal of chromatography A* [online]. 2010, 7972–7980 [cit. 2016-11-12]. Dostupné z: [www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)
- [3] Slanina, J., Taborska, E.; Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka, *Chem. Listy*, 98, 239-245 (2004)
- [4] DZIAŁO, Magdalena, Justyna MIERZIAK, Urszula KORZUN, Marta PREISNER, Jan SZOPA a Anna KULMA. The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2016, 17(2), 160- [cit. 2017-03-10]. DOI: 10.3390/ijms17020160. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/2/160>
- [5] KOPEC, Karel. Zelenina ve výživě člověka. Praha: Grada, 2010. Zdraví. ISBN 978-80-247-2845-2.
- [6] PACKER, Lester. Flavonoids and other polyphenols. San Diego: Academic Press, c2001. Methods in enzymology. ISBN 0-12-182236-2.
- [7] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. 3. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-86659-02-X
- [8] FENNEMA, Owen R. (ed.). Food chemistry. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, c1996. Food science and technology. ISBN 08-247-9691-8.
- [9] VESPALCOVÁ, Milena, Jitka CETKOVSKÁ, Barbora HOHNOVÁ, Lenka ŠTAVÍKOVÁ a Aleš MATĚJÍČEK. RUTIN V ODPADU Z VÝSADEB BEZU ČERNÉHO. *Chemické listy* [<http://www.chemicke-listy.cz/cz/index.html>]. 2012, (106), 568 [cit. 2016-11-25]. ISSN1213-7103. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012\\_06\\_568-570.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_06_568-570.pdf)
- [10] Kreft, I., Fabjan, N., Yasumoto, K.; Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products, *Food Chemistry*, 98, 508-512 (2006)
- [11] CUI, Xiao-dong a Zhuan-hua WANG. Preparation and properties of rutin-hydrolyzing enzyme from tartary buckwheat seeds. *Food chemistry* [online]. 2012, 1(132), 60-66 [cit. 2017-03-03]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0308814611014828>
- [12] ZHANG, Ru a Bian-Ling ZHANG. Increase of rutin antioxidant activity by generating Maillard reaction products with lysine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [online]. 2016, 26(11), 2680-2684 [cit. 2017-03-04]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0960894X16303699>

- [13] HELENOA, Sandrina A., Anabela MARTINSA, Maria JOÃO R.P. QUEIROZB a Isabel C.F.R. FERREIRA. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food chemistry* [online]. 2015, (173), 501-513 [cit. 2017-03-05]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0308814614016197>
- [14] FUENTES, Eduardo, Julio CABALLERO, Marcelo ALARCÓN, Armando ROJAS, Iván PALOMO a Christian SCHULZ. Chlorogenic Acid Inhibits Human Platelet Activation and Thrombus Formation. *PLoS ONE* [online]. 2014-3-5, **9**(3), e90699- [cit. 2017-03-11]. DOI: 10.1371/journal.pone.0090699. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0090699>
- [15] ARENBERGER, Petr a Iva OBSTOVÁ. *Obecná dermatovenerologie*. Praha: Czechopress Agency, 2001. ISBN 80-902-6324-0
- [16] *Slideplayer* [online]. [cit. 2017-05-03]. Dostupné z: <http://slideplayer.cz/slide/4882442/>
- [17] TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-247-0512-5. Dostupné také z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:a609edd0-05ef-11e6-a611-005056827e51>
- [18] KOTINGOVÁ, Lenka, Lenka BORSKÁ a Zdeněk FIALA. Testování transdermální absorpce chemických látek in vitro. *Chemické Listy* [online]. 2009, (103), 533-539 [cit. 2017-03-31]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009\\_07\\_533-539.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_07_533-539.pdf)
- [19] FERTEKOVÁ, Vlasta. *Kosmetika v teorii a v praxi*. 4., aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf, 2005. ISBN 80-734-5046-1.
- [20] DIEMBECK, W., H. BECK, F. BENECH-KIEF, et al. The guidelines for in vitro assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. *Food and chemical toxicology* [online]. (37), 191-205 [cit. 2017-04-01]. Dostupné z: [http://ac.els-cdn.com/S0278691598001148/1-s2.0-S0278691598001148-main.pdf?\\_tid=a7d09024-16b5-11e7-9cea-00000aab0f01&acdnat=1491035691\\_df1cb6bd802921af221eb440fecb818d](http://ac.els-cdn.com/S0278691598001148/1-s2.0-S0278691598001148-main.pdf?_tid=a7d09024-16b5-11e7-9cea-00000aab0f01&acdnat=1491035691_df1cb6bd802921af221eb440fecb818d)
- [21] THITILERTDECHAA, Premrutai, Michel G. ROWANA a Richard H. GUYA. Topical formulation and dermal delivery of active phenolic compounds in the Thai medicinal plant – *Clerodendrum petasites* S. Moore. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 478(1), 39-45 [cit. 2017-04-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517314007984>
- [22] MUHAMMAD, Faqir a Jim E. RIVIERE. Differential effects of some natural compounds on the transdermal absorption and penetration of caffeine and salicylic acid. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2015, **1-2**(483), 151-157 [cit. 2017-04-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517315001258>
- [23] ŽILIUS, Modestas, Kristina RAMANAUSKIENĖ a Vitalis BRIEDIS. Release of Propolis Phenolic Acids from Semisolid Formulations and Their Penetration into the Human Skin In Vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2013, **2013**, 1-7 [cit. 2017-04-04]. DOI: 10.1155/2013/958717. ISSN 1741-427x. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/958717/>

- [24] ABDULLAHA, Yana, Bernd SCHNEIDERB a Maike PETERSEN. Occurrence of rosmarinic acid, chlorogenic acid and rutin in Marantaceae species. *Phytochemistry Letters* [online]. 2008, 1(4), 199-203 [cit. 2017-04-07]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874390008000670>
- [25] MAOA, Zhiyi, Ruifeng SHANA, Jiajun WANGB, Wensheng CAIA a Xueguang SHAO. Optimizing the models for rapid determination of chlorogenic acid, scopoletin and rutin in plant samples by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 2014, **128**, 711-715 [cit. 2017-04-07]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386142514004168>
- [26] HUNYADI, Attila, Ana MARTINS, Tusty-Juan HSIEH, Adrienn SERES, István ZUPKÓ a Bridget WAGNER. Chlorogenic Acid and Rutin Play a Major Role in the In Vivo Anti-Diabetic Activity of Morus alba Leaf Extract on Type II Diabetic Rats. *PLoS ONE* [online]. 2012, 7(11), e50619- [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.1371/journal.pone.0050619. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0050619>
- [27] BOHÁČOVÁ, H. Obsah rutinu v odpadním biologickém materiálu z výsadeb bezu černého. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 77 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
- [28] Han, S.; Qiao, J.; Zhang, Y.; Lian, H.; Ge, X.: Determination of noctanol/water partition coefficients of weak ionizable solutes by RPHPLC with neutral model compounds. *Talanta* 97, 355–61 (2012).
- [29] EDITORS, ROBERT P. CHILCOTT a AND SHIRLEY PRICE. *Principles and practice of skin toxicology*. Chichester, England: John Wiley, 2008. ISBN 978-047-0511-725.
- [30] *Bezpečnostní list Rutin trihydrát*. In: . 2016. Dostupné také z: [http://www.carlroth.com/downloads/sdb/cs/7/SDB\\_7422\\_CZ\\_CS.pdf](http://www.carlroth.com/downloads/sdb/cs/7/SDB_7422_CZ_CS.pdf)
- [31] Chemicallyland21 [online]. [cit. 2017-05-03]. Dostupné z: <http://chemicallyland21.com/specialtychem/nd/CHLOROGENIC%20ACID.html>
- [32] BOS, J. D. and M. H. M. Meinardi. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Experimental Dermatology* [online]. 2000 **9**(3), 165-169 [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1600-0625.2000.009003165.x/epdf>
- [33] POHANKA, M. Základy statistiky laboratorních experimentů. *Vojenské zdravotnické listy* [online]. 2010, **129**(2), 60-63 [cit. 2017-04-15]. Dostupné z: [https://www.unob.cz/fvz/fakulta/Documents/VZL/2010/2\\_2010/5\\_Pohanka.pdf](https://www.unob.cz/fvz/fakulta/Documents/VZL/2010/2_2010/5_Pohanka.pdf)
- [34] PIŠŤKOVÁ, M. Obsah rutinu ve vybraných odrůdách bezu černého. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 71 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

<i>Zkratka</i>	<i>Význam zkratky</i>
Co-A	Koenzym A
NOS	Syntáza oxidu dusného
LDL	Low density lipoprotein (nízkodenzitní lipoproteiny)
VLDL	Very low density lipoprotein (velmi nízkodenzitní lipoproteiny)
ROS	Reaktivní kyslíkaté sloučeniny
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
WHO	Světová zdravotnická organizace
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MeOH	Methanol
DAD	Detektor s diodovým polem
Log $k_{ow}$	Rozdělovací koeficient
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
DNA	Deribonukleová kyselina
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid



## 8 SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA 1 Chromatogram zkušebního roztoku kyseliny chlorogenové, která prošla membránou o velikosti pórů 0,40  $\mu\text{m}$ .

PŘÍLOHA 2 Chromatogram zkušebního roztoku kyseliny chlorogenové, která prošla přes kůži.

PŘÍLOHA 3 Chromatogram zkušebního roztoku rutinu, který prošel přes membránu 0,40  $\mu\text{m}$ .

PŘÍLOHA 4 Chromatogram zkušebního roztoku rutinu, který prošel přes kůži.

PŘÍLOHA 5 Chromatogram extraktu bezu černého, který prošel přes membránu 0,40  $\mu\text{m}$ .

PŘÍLOHA 6 Chromatogram extraktu bezu černého, který prošel přes kůži.

PŘÍLOHA 7 Souhrnná tabulka naměřených hodnot prostupu rutinu přes membránu 0,23  $\mu\text{m}$ .

PŘÍLOHA 8 Souhrnná tabulka naměřených hodnot prostupu rutinu přes membránu 0,40  $\mu\text{m}$ .

PŘÍLOHA 9 Souhrnná tabulka naměřených hodnot prostupu rutinu přes kůži.

PŘÍLOHA 10 Souhrnná tabulka naměřených hodnot prostupnosti kyseliny chlorogenové přes membránu 0,23  $\mu\text{m}$ .

PŘÍLOHA 11 Souhrnná tabulka naměřených hodnot prostupnosti kyseliny chlorogenové přes membránu 0,40  $\mu\text{m}$ .

PŘÍLOHA 12 Souhrnná tabulka naměřených hodnot propustnosti kyseliny chlorogenové přes kůži.

PŘÍLOHA 13 Souhrnná tabulka naměřených hodnot propustnosti směsi přes membránu 0,23  $\mu\text{m}$ .

PŘÍLOHA 14 Souhrnná tabulka naměřených hodnot propustnosti směsi přes membránu 0,40  $\mu\text{m}$ .

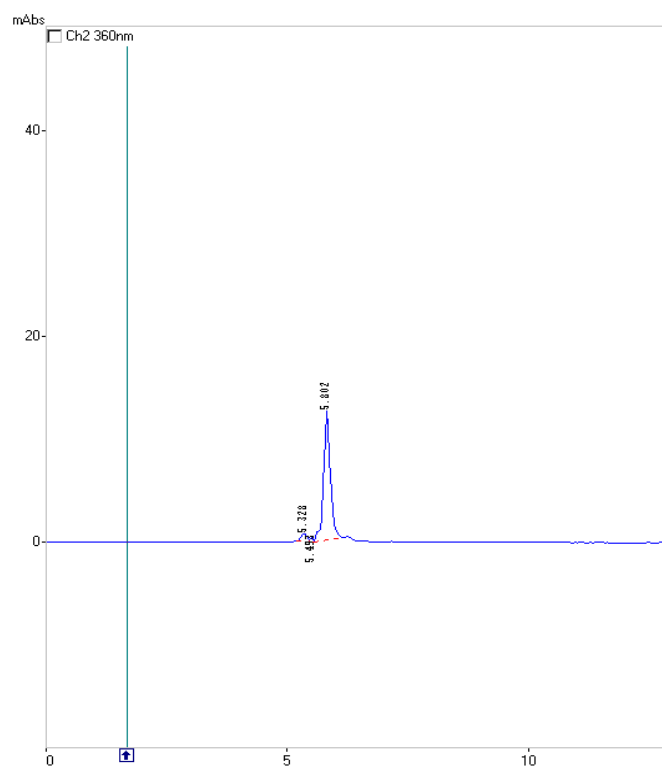
PŘÍLOHA 15 Souhrnná tabulka naměřených hodnot propustnosti směsi přes kůži.

PŘÍLOHA 16 Souhrnná tabulka naměřených hodnot propustnosti extraktu přes membránu 0,23  $\mu\text{m}$ .

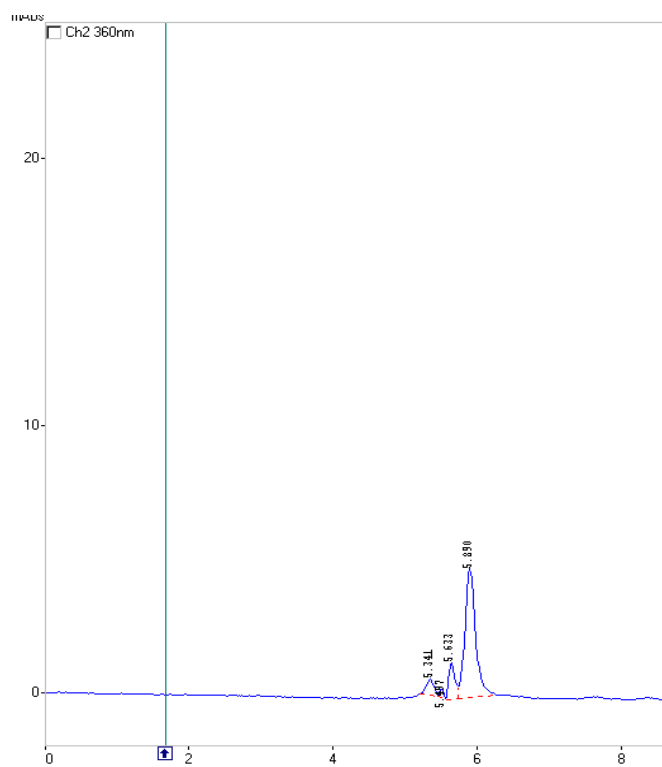
PŘÍLOHA 17 Souhrnná tabulka naměřených hodnot prostupnosti extraktu přes membránu 0,40  $\mu\text{m}$ .

PŘÍLOHA 18 Souhrnná tabulka naměřených hodnot prostupnosti extraktu přes kůži.

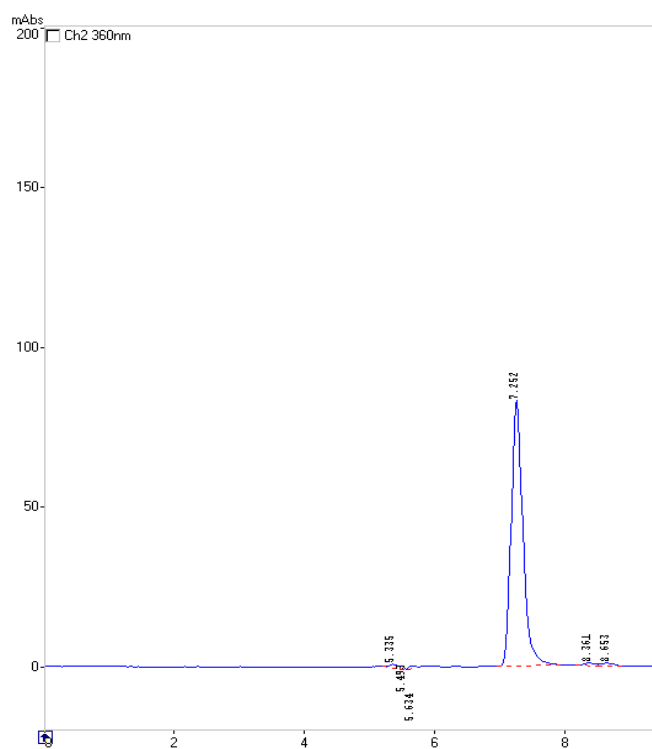
## PŘÍLOHA 1



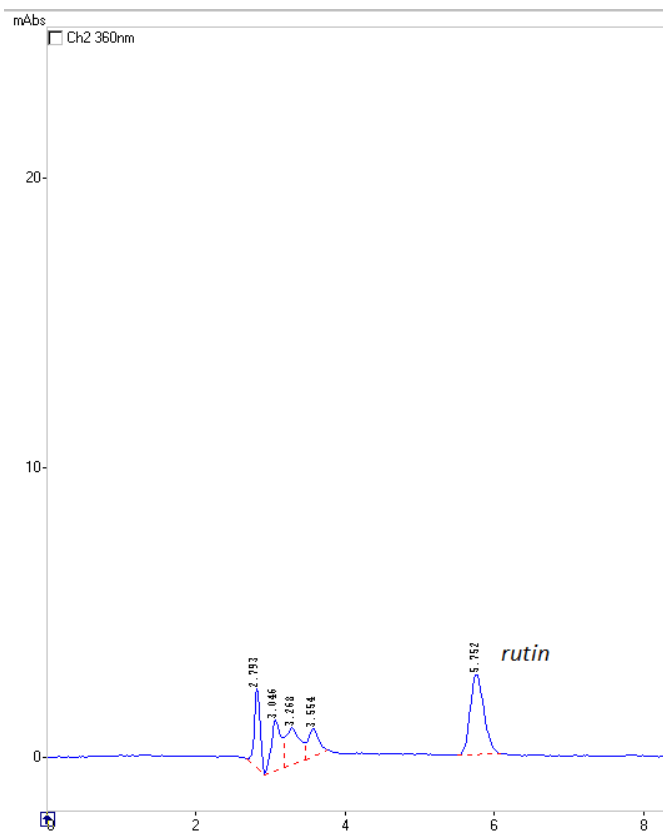
## PŘÍLOHA 2



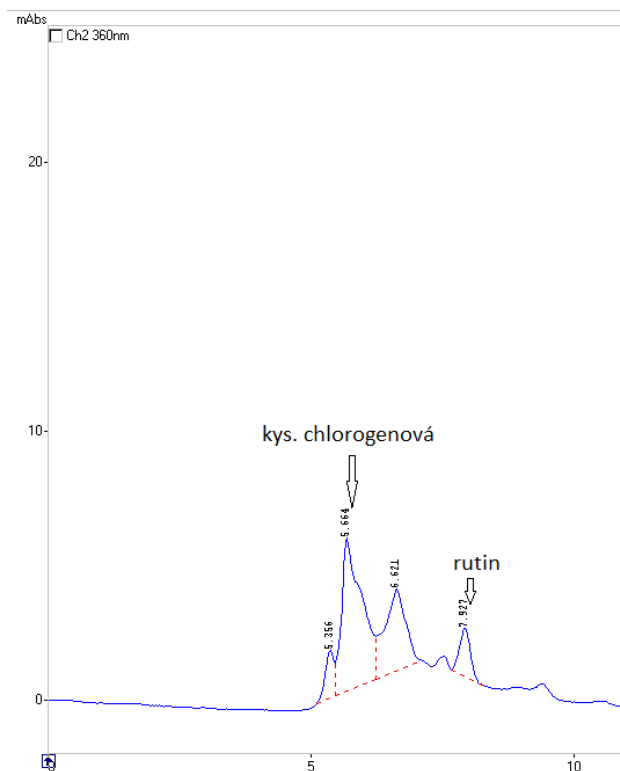
### PŘÍLOHA 3



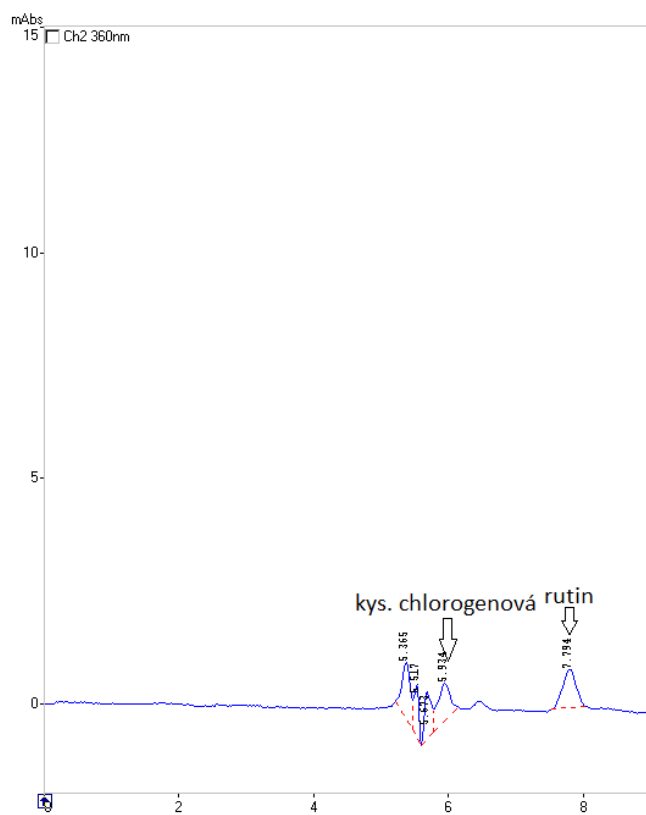
### PŘÍLOHA 4



## PŘÍLOHA 5



## PŘÍLOHA 6



# PŘÍLOHA 7

	vzorek	retenční čas	plocha píku	výška píku	doba působení	koncentrace (g/l)	Hmotnost absorb. látky (mg)	Absorpce (%)
1.měření	1.rutin				30 min	nic	0,0000	0
	2.rutin				60 min	nic	0,0000	0
	3.rutin	žádný odpovídající pík				nic	0,0000	0
2.měření	1.rutin	7,46	13 567,00	1 041,00	30 min	0,00053	0,0106	2,12
	2.rutin	7,44	13 451,33	1 025,33	60 min	0,00052	0,0104	2,08
	3.rutin	7,53	165 290,66	10 633,66	24 hod	0,00288	0,0576	11,52

# PŘÍLOHA 8

	vzorek	retenční čas	plocha píku	výška píku	doba působení	koncentrace (g/l)	hmotnost absorb. látky (mg)	Absorpce (%)
1.měření	1.rutin	5,47	32 543,00	998,66	30 min	0,00082	0,0164	3,28
	2.rutin	5,52	38 707,66	3 327,00	60 min	0,00092	0,0184	3,68
	3.rutin	5,67	90 185,66	7 466,33	24 hod	0,00171	0,0342	6,84
2.měření	1.rutin	7,34	370 805,00	28 398,66	30 min	0,00607	0,1214	24,28
	2.rutin	7,26	1 032 519,66	81 278,33	60 min	0,01633	0,3266	65,32
	3.rutin	7,21	1 546 956,47	414 891,33	24hod	0,02431	0,4861	97,22

## PŘÍLOHA 9

	vzorek	retenční čas	plocha píku	výška píku	doba působení	koncentrace (g/l)	hmotnost absorb. látky (mg)	Absorpce (%)
1.měření	1.rutin	5,81	30 783,00	2 416,33	30 min	0,00079	0,0158	3,16
	2.rutin	5,77	36 165,00	4 315,00	60 min	0,00088	0,0176	3,52
	3.rutin	žádný odpovídající pík			24 hod	0,00000	0,0000	0
2.měření	1.rutin	7,88	30 881,33	2 134,33	30 min	0,00080	0,0160	3,20
	2.rutin	7,62	1 513 100,88	494 823,66	60 min	0,02378	0,4755	95,10
	3.rutin	7,59	94 462,33	6 590,55	24 hod	0,00178	0,0356	7,12

## PŘÍLOHA 10

	vzorek	retenční čas	plocha píku	výška píku	doba působení	koncentrace (g/l)	Hmotnost absorb. látky (mg)	Absorpce (%)
1. měření	1.k. chlorogenová	5,77	69 636,00	5 758,66	30 min	0,00260	0,0520	10,40
	2.k. chlorogenová	5,77	89 011,00	7 295,66	60 min	0,00324	0,0648	12,96
	3.k. chlorogenová	5,78	41 476,66	3 072,66	24 hod	0,00176	0,0352	7,04
2.měření	1.k. chlorogenová	5,80	31 349,33	2 889,66	30 min	0,00144	0,0288	5,76
	2.k. chlorogenová	5,79	73 722,00	6 275,33	60 min	0,00276	0,0552	11,04
	3.k. chlorogenová	5,81	416 264,00	38 159,00	24 hod	0,01343	0,2680	53,60

## PŘÍLOHA 11

	vzorek	retenční čas	plocha píku	výška píku	doba působení	koncentrace (g/l)	Hmotnost absorb. látky (mg)	absorpce (%)
1.měření	1.k.chlorogenová	5,79	151 285,66	12 041,00	30 min	0,00517	0,1034	20,68
	2.k. chlorogenová	5,77	136 856,66	11 595,00	60 min	0,00473	0,0946	18,92
	3.k. chlorogenová	5,77	323 125,33	26 078,66	24 hod	0,01023	0,0246	40,92
2.měření	1.k.chlorogenová	5,81	64 006,66	5 775,00	30 min	0,00246	0,0492	9,84
	2.k. chlorogenová	5,80	134 554,33	13 518,33	60 min	0,00466	0,0932	18,64
	3.k. chlorogenová	5,80	426 387,00	44 754,33	24 hod	0,01375	0,2750	55,00

## PŘÍLOHA 12

	vzorek	retenční čas	plocha píku	výška píku	doba působení	koncentra (g/l)	Hmotnost absorb. látky (mg)	Absorpce ( %)
1.měření	1.k.chlorogenová	5,84	200 929,33	17 560,66	30 min	0,00673	0,1346	26,92
	2.k. chlorogenová	5,70	8 620,50	920,50	60 min	0,00074	0,0148	2,96
	3.k. chlorogenová	příliš malé píky-KCH asi oxidovala			24 hod	0,00000	0,0000	0
2.měření	1.k.chlorogenová	5,92	186 764,00	16 378,00	30 min	0,00628	0,1256	25,12
	2.k. chlorogenová	5,89	52 432,00	5 056,33	60 min	0,00210	0,0420	8,40
	3.k. chlorogenová	5,87	9 504,33	940,33	24 hod	0,00076	0,0152	3,04



## PŘÍLOHA 13

	vzorek	plocha píku		doba působení		koncentrace (g/l)		Množství absorb. látky (mg)		absorpce %	
		RUTIN	K.CHLOROGEN.	RUTIN	K.CHLOROGEN.	RUTIN	K.CHLOROGEN.	RUTIN	K. CHLOROGEN.	RUTIN	K.CHLOROGEN.
1.měření	1.	22 036,00	656 283,66	30 min	30 min	0,00066	0,02091	0,0132	0,4182	5,25	8,364
	2.	49 194,33	1 063 717,33	60 min	60 min	0,00108	0,03359	0,0216	0,6718	8,64	13,436
	3.	324 606,00	5 638 859,66	22 hod	24 hod	0,00535	0,17606	0,107	3,5212	42,8	70,424
2.měření	1.	282 077,66	536 644,33	30 min	30 min	0,00469	0,01718	0,0938	0,3436	37,52	6,872
	2.	24 963,33	855 292,33	60 min	60 min	0,00070	0,02710	0,014	0,542	5,6	10,84
	3.	320 301,66	3 750 693,66	23 hod	24 hod	0,00528	0,11726	0,1056	2,3452	42,24	46,904

## PŘÍLOHA 14

	vzorek	plocha píku		doba působení		koncentrace (g/l)		Množství absorb. látky (mg)		absorpce %	
		RUTIN	K.CHLOROGEN.	RUTIN	K.CHLOROGEN.	RUTIN	K.CHLOTOGEN	RUTIN	K.CHLOROGEN.	RUTIN	K.CHLOROGEN.
1.měření	1.	127 884,33	563 298,33	30 min	30 min	0,00230	0,01801	0,046	0,3602	18,4	7,204
	2.	34 703,00	780 925,33	60 min	60 min	0,00085	0,02479	0,017	0,4958	6,8	9,916
	3.	339 209,00	3 698 588,66	24 hod	24 hod	0,00558	0,11564	0,1116	2,3128	44,64	46,256
2.měření	1.	20 090,00	461 688,66	30 min	30 min	0,00063	0,01485	0,0126	0,297	5,04	5,94
	2.	31 100,33	650 059,00	60 min	60 min	0,00080	0,02071	0,016	0,4142	6,4	8,284
	3.	301 498,33	3 665 111,33	24 hod	24 hod	0,00499	0,11460	0,0998	2,292	39,92	45,84

## PŘÍLOHA 15

	vzorek	plocha píku		doba působení		koncentrace (g/l)		Množství absorb. látky (mg)		absorpce %	
		RUTIN	K.CHLOROGEN.	RUTIN	K.CHLOROGEN.	RUTIN	K.CHLOROGEN.	RUTIN	K.CHLOROGEN.	RUTIN	K.CHLOROGEN.
1.měření	1.	215 391,00	101 265,00	30 min	30 min	0,00366	0,00362	0,0732	0,0724	29,28	1,448
	2.	43 877,33	35 555,00	60 min	60 min	0,00100	0,00158	0,0200	0,0316	8	0,632
	3.	31 056,66	872 752,66	24 hod	24 hod	0,00080	0,02765	0,0160	0,5530	6,4	11,06
2.měření	1.	NIC	10 398,50	30 min	30 min	nic	0,00079	0,0000	0,0158	0	0,316
	2.	NIC	17 922,33	60 min	60 min	nic	0,00103	0,0000	0,0206	0	0,412
	3.	45 929,00	957 646,00	24 hod	24 hod	0,00103	0,03029	0,0206	0,6078	8,24	12,156

## PŘÍLOHA 16

	vzorek	plocha píku		doba působení		koncentrace (g/l)		Množství absorb. látky (mg)		Absorpce (%)	
		RUTIN	K.CHLOROGEN.	RUTIN	K.CHLOROGEN.	RUTIN	K.CHLOROGEN.	RUTIN	K.CHLOROGEN.	RUTIN	K.CHLOROGEN.
1.měření	1.	10 132,00	9 621,50	30 min	30 min	0,00047	0,00077	0,0094	0,0154	15,359	4,904
	2.		7 759,77	60 min	60 min		0,00071	0,0000	0,0142	0	4,522
	3.		12 636,00	24 hod	24 hod		0,00086	0,0000	0,0172	0	5,477
2.měření	1.	11 897,00	10 718,00	30 min	30 min	0,00050	0,00080	0,0100	0,0160	16,339	5,095
	2.		5 694,66	60 min	60 min		0,00065	0,0000	0,0130	0	4,14
	3.		9 219,66	24 hod	24 hod		0,00076	0,0000	0,0152	0	4,84

## PŘÍLOHA 17

	vzorek	plocha píku		doba působení		koncentrace (g/l)		Množství absorb. látky (mg)		Absorpce %	
		RUTIN	K.CHLOROGEN.	RUTIN	K.CHLOROGEN.	RUTIN	K.CHLOROGEN.	RUTIN	K.CHLOROGEN.	RUTIN	K.CHLOROGEN.
1.měření	1.		7 193,66	30 min	30 min		0,00069	0,0000	0,0138	0	4,413
	2.		7 902,00	60 min	60 min		0,00071	0,0000	0,0142	0	4,553
	3.	47 124,33	243 316,66	24 hod	24 hod	0,00105	0,00805	0,0209	0,1609	34,2217	51,246
2.měření	1.		7 848,33	30 min	30 min		0,00071	0,0000	0,0142	0	4,543
	2.		10 624,33	60 min	60 min		0,00080	0,0000	0,0159	0	5,093
	3.	25 199,33	103 502,00	24 hod	24 hod	0,00071	0,00369	0,0141	0,0739	23,106	23,56

## PŘÍLOHA 18

	vzorek	plocha píku		doba působení		koncentrace (g/l)		Množství absorb. látky (mg)		Absorpce %	
		RUTIN	K.CHLOROGEN.	RUTIN	K.CHLOROGEN.	RUTIN	K.CHLOROGEN.	RUTIN	K.CHLOROGEN.	RUTIN	K.CHLOROGEN.
1.měření	1.		8 257,00	30 min	30 min		0,00073	0,0000	0,0145	0	4,624
	2.		7 644,33	60 min	60 min		0,00071	0,0000	0,0141	0	4,502
	3.	22 666,50	482 162,71	24 hod	24 hod	0,00067	0,01548	0,0133	0,3096	21,822	98,62
2.měření	1.		12 928,66	30 min	30 min		0,00087	0,0000	0,0174	0	5,547
	2.		60 593,00	60 min	60 min		0,00236	0,0000	0,0471	0	15,004
	3.		197 229,66	24 hod	24 hod		0,00661	0,0000	0,1320	0	42,105